

Aus dem Institut für Anatomie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Markus Kipp

**Volumetrische Veränderungen limbischer Kortextareale
im Morbus Niemann-Pick Typ C1 Mausmodell
unter Therapien mit
Cyclodextrin, Allopregnanolon und Miglustat**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der

Universitätsmedizin Rostock

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Wree

vorgelegt von

Katharina Seidel, geb. am 31.03.1995 in Neubrandenburg

Rostock | 2020

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 25.05.2020

Datum der Verteidigung: 15.12.2020

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. med. Andreas Wree
Universitätsmedizin Rostock, Institut für Anatomie,
Gertrudenstraße 9, 18057 Rostock
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. med. Alexander Storch
Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Nervenheilkunde,
Klinik und Poliklinik für Neurologie, Gehlsheimer Str. 20, 18147 Rostock
- 3. Gutachter:** PD Dr. rer. nat. Nicola Palomero-Gallagher
Institute of Neuroscience and Medicine (INM-1),
Research Centre Jülich, 52425 Jülich

*Allein in Deutschland leben Schätzungen zufolge etwa
vier Millionen Menschen mit einer seltenen Erkrankung, in
der gesamten EU geht man von **30 Millionen Menschen** aus.*

(Bundesministerium für Gesundheit, 17. Oktober 2019)

Teile dieser Dissertation wurden als Poster veröffentlicht:

*2nd International Congress on Advance Treatments in Rare Diseases
(Österreich, Wien, 04.03.19 - 05.03.2019)*

Diana Heimes, Jennifer Schulz, **Katharina Seidel**, Oliver Schmitt, Arndt Rolfs, Carsten Holzmann
and Andreas Wree

*Changes induced by Miglustat, Cyclodextrin and Combination Treatment on Brain Volumes of NPC1
Mutant Mice*

Abkürzungsverzeichnis

AAV9	Adeno-associated virus serotype 9
AE	Area entorhinalis
AC	anteriöer Coronalschnitt
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AP1	Adaptor protein 1
ATP	Adenosintriphosphat
BO	Bulbus olfactorius
BPT	By-Product-Replacement-Therapy
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CA	Cornu Ammonis
CA1	Cornu Ammonis Region 1
CA3	Cornu Ammonis Region 3
Cho-/Kr	Choline/Kreatin-Ratio
CT	Computertomographie
DG	Gyrus dentatus
dMEK	dorsaler Part des medialen entorhinalen Kortex
DNA	Desoxyribonucleic acid
EU	Europäische Union
EMA	European Medicine Agency
FG	Frischgewicht
FDA	Food and Drug Administration
FIRST	FMRIB Integrated Registration and Segmentation Tool
FMRIB	Functional Magnetic Resonance Imaging of the Brain
FV	Frischvolumen
FYCO1	FYVE And Coiled-Coil Domain Autophagy Adaptor 1
FYVE	Akronym für Fab 1, YOTB, Vac 1, EEA1
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GM2	Monosialic-Gangliosid 2
GM3	Monosialic-Gangliosid 3
GSH	Glutathion
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HPBCD	2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	knock-out
LAL	lysosomal acid lipase
LDL	low density Lipoprotein
LE	late endosome
LEK	lateraler entorhinaler Kortex
Lyso-SM-509	Lysosphingomyelin 509
MCOLN1	Mucolipin-1-Gen
MEK	medialer entorhinaler Kortex
MRT	Magnetresonanztomographie

NOA	Nucleus olfactorius anterior
NPC	Niemann-Pick Typ C
NPC1	Niemann-Pick Typ C1
Npc1^{-/-}	Genotyp: homozygot für das Niemann-Pick Typ C1-Allel
Npc1^{+/+}	Genotyp: homozygot für das Wildtyp-Allel
NPC1L1	Niemann-Pick-Typ-C1-like protein 1
NPCBA1	3 β -hydroxy,7 β - <i>N</i> -acetylglucosaminy-5-cholenoic acid
NPCBA2	3 β ,5 α ,6 β -trihydroxycholanoyl-glycine
ORX-301	Eigenname einer Polymer-Prodrug-Version von H β CD
PC	posteriorer Coronalschnitt
PATCHED	protein-patched-homolog
PIRI	Piriformer Kortex
PS	Präsubiculum – und Parasubiculum
RG	Referenzgewicht
RIP	receptor-interacting-protein-kinase
RV	Referenzvolumen
S	Subiculum
SCAP	SCREBP-cleavage-activating-protein
SMPD-1	Sphingomyelinphosphodiesterase-1-Gen
SPC	sphingosylphosphorylcholine
SREBP	sterol regulatory element binding protein
SRT	Substrat-Reduction-Therapy
SV	Schnittvolumen
TRND	Therapeutics for Rare and Neglected Diseases
VBM	Voxel-basierte Morphometrie
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Morbus Niemann Pick Typ C1	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie und Geschichte	1
1.1.2	Pathogenese	2
1.1.3	Diagnose	5
1.1.4	Klinischer Verlauf	6
1.2	Therapie	8
1.2.1	Miglustat (N-Butyldeoxynojirimycin) $C_{10}H_{21}NO_4$	9
1.2.2	Allopregnanolon (Pregnan-3alpha-ol-20-one) $C_{21}H_{34}O_2$	11
1.2.3	Cyclodextrin (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) $C_{54}H_{102}O_{39}$	12
1.2.4	Kombinationstherapie	14
1.2.5	weitere Therapien	15
1.3	Tiermodell und bisherige Erkenntnisse zur Neuropathologie	17
1.4	Geschichte des Hippocampus	18
1.5	Anatomie des Hippocampus	19
1.6	Zytoarchitektur und Verbindungen des Hippocampus	20
1.7	Das limbische System und die Funktionsweise definierter kortikaler Strukturen	21
1.7.1	Cornu Ammonis Region 1	21
1.7.2	Cornu Ammonis Region 3	21
1.7.3	Gyrus dentatus	21
1.7.4	Subiculum, Prä – und Parasubiculum	22
1.7.5	Piriformer Kortex	22
1.7.6	Area entorhinalis	23
1.8	Bedeutung des Hippocampus und Neuropathologische Veränderungen im limbischen System bei NPC1	23
1.9	Fragestellung der Arbeit	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Versuchstiere und Tierhaltung	26
2.2	Pharmakologische Therapie	27
2.2.1	SRT/BPT-Kombinationstherapie	28
2.2.2	Cyclodextrin-Monotherapie	28
2.2.3	Miglustat-Monotherapie	28
2.2.4	Scheinbehandlung	28
2.2.5	Verwendete Pharmaka	28
2.3	Bestimmung des Körpergewichts der Versuchstiere	28

2.4	Histologische Aufarbeitung.....	28
2.4.1	Präparation und Gewebeaufarbeitung	28
2.4.2	Färbung nach Nissl.....	29
2.5	Definition der untersuchten kortikalen Strukturen	30
2.5.1	Begrenzung von CA1 und CA3.....	30
2.5.2	Begrenzung des Gyrus dentatus	32
2.5.3	Begrenzung des Subiculus.....	33
2.5.4	Begrenzung des Para-, Prä- und Postsubiculus	34
2.5.5	Begrenzung der Area entorhinalis	35
2.5.6	Begrenzung des piriformen Kortex	36
2.6	Bestimmung der Volumina mit Hilfe der Cavalieri-Estimator-Methode	37
2.6.1	Bestimmung des Frischvolumens eines definierten Areal.....	39
2.7	Statistische Auswertung.....	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Normalverteilung der Schrumpfungsfaktoren	40
3.2	Daten der Hirn- und Körpergewichte	42
3.2.1	Reduziertes Körpergewicht bei NPC1 ^{-/-} im Vergleich zu NPC1 ^{+/+}	42
3.2.2	Reduziertes Gehirngewicht bei NPC1 ^{-/-} im Vergleich zu NPC1 ^{+/+}	44
3.2.3	Hirn-/Körpergewicht-Quotient erhöht bei scheinbehandelten NPC ^{-/-} Mäusen	46
3.3	Ergebnisse der Volumenvermessung	47
3.3.1	Volumen von CA1 bei NPC1 ^{-/-} gegenüber NPC1 ^{+/+} reduziert.....	47
3.3.2	Keine signifikanten volumetrischen Unterschiede in CA3	49
3.3.3	Signifikante Veränderungen des Gyrus dentatus in der Sham-Versuchsgruppe	51
3.3.4	Sham-Gruppe zeigt signifikante Volumenunterschiede im Subiculum.....	53
3.3.5	Keine signifikanten volumetrischen Unterschiede im Prä- und Parasubiculum.....	55
3.3.6	Volumetrische Unterschiede in der Area entorhinalis.....	57
3.3.7	Sham-Gruppe zeigt volumetrische Unterschiede im piriformen Kortex	59
3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
4	Diskussion.....	61
4.1	Beurteilung des Tiermodells.....	61
4.2	Kritische Beurteilung der Pharmakotherapie	62
4.3	Gewichtsunterschiede innerhalb der Gruppen.....	63
4.4	Unterschiede des Hirngewichts	64
4.5	Volumenbestimmung limbischer Areale	65
4.5.1	Cornu Ammonis Region 1	66
4.5.2	Cornu Ammonis Region 3.....	67

4.5.3	Gyrus dentatus	68
4.5.4	Subiculum.....	69
4.5.5	Präsubiculum und Parasubiculum	69
4.5.6	Area enthorinalis	70
4.5.7	Piriformer Kortex	71
4.6	Gewichts- und Volumenveränderungen innerhalb der therapierten NPC1 ^{+/+} Versuchsgruppen.....	72
4.7	Kritische Beurteilung der Messmethode	74
4.8	Schlussfolgerung und Ausblick.....	75
5	Literaturverzeichnis	77
6	Abbildungsverzeichnis	95
7	Formelverzeichnis	95
8	Tabellenverzeichnis	96
9	Thesen.....	97
10	Anhang	99
10.1	PCR-Protokoll für die Genotypisierung	99
10.2	Fixierung nach Bodian	100
10.3	Histologische Färbung nach Nissl	101
10.4	Verwendete Geräte und Software.....	102
10.5	Gesamtübersicht der Versuchstiere	103
10.6	Eidesstattliche Erklärung.....	105
10.7	Anerkennung	105
10.8	Danksagung	106
10.9	Lebenslauf	107

1 Einleitung

1.1 Morbus Niemann Pick Typ C1

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Geschichte

Morbus Niemann-Pick Typ C (NPC) ist eine seltene autosomal-rezessive vererbte Stoffwechselerkrankung aus der Gruppe lysosomaler Speicherkrankheiten (Grau et al., 2003; Mengel et al., 2012). Die gestörte zelluläre Verteilung und Zirkulation von Cholesterin und anderen Fetten bedingt eine fehlgesteuerte lysosomale Lipidspeicherung in zahlreichen Geweben wie Gehirn, Milz und Leber (Grau et al., 2003). Diesen primären viszerale Befunden folgt ein fortschreitender neurodegenerativer Verlauf, der häufig Jahre und manchmal Jahrzehnte später eintritt (Mengel et al., 2012). Laut dem Bundesministerium für Gesundheit gilt in der Europäischen Union eine Erkrankung als selten, wenn nicht mehr als 5 von 10.000 Menschen in der EU von ihr betroffen sind (Bundesministerium für Gesundheit, 2020). Die Prävalenzangaben beim Morbus Niemann Pick Typ C1 schwanken zwischen 0,35 und 2,2 Fällen auf 100.000 Lebendgeburten (Mengel et al., 2012) und deklarieren die lysosomale Lipidspeicherkrankheit NPC somit als seltene Erkrankung. Allerdings ist es gut vorstellbar, dass die wahre Prävalenzzahl aufgrund potentieller Schwierigkeiten bei der Diagnosestellung unterschätzt wird. In Deutschland sind circa 60 Familien mit erkrankten lebenden Angehörigen bekannt (Mengel et al., 2012). Die Erstbeschreibung und die Namensgebung des heterogenen Krankheitsbildes Morbus Niemann-Pick sind auf den deutschen Pädiater Albert Niemann (1880-1921) und den deutschen Pathologen Ludwig Pick (1868-1944) zurückzuführen (Neurologienetz, 2020). Während Albert Niemann 1914 Ähnlichkeiten zur Erkrankung Morbus Gaucher beschrieb, wies Ludwig Pick 1927 nach, dass sich beide Erkrankungen trotz Gemeinsamkeiten unterscheiden (Pentchev, 2004). Die heterogene Lipidspeicherstörung Niemann-Pick wurde schließlich von Crocker und Farber (1958) anhand ihres klinischen Auftretens und ihres biochemischen Phänotyps in drei Subtypen A - C unterteilt (Pentchev, 2004). Gruppe A umfasst Kinder mit ausgeprägter ZNS-Beteiligung und führt noch vor Eintritt in das Jugendalter zum Tode; Patienten der Gruppe B zeigen lediglich eine Organomegalie ohne neurologische Beteiligung und Gruppe-C-Patienten weisen eine progressive neurologische Degeneration auf (Pentchev, 2004). Während für die Subtypen A und B ein mutiertes SMPD1-Gen (Sphingomyelinphosphodiesterase-1-Gen) für den Defekt der sauren Sphingomyelinase ursächlich gemacht werden konnte (Brady et al., 1966), gelang es für den Subtyp C viele Jahre nicht (Pentchev, 2004). Es wurde vermutet, dass nicht wie bis dahin angenommen Sphingomyelin, sondern die Akkumulation von Cholesterol eine entscheidende Rolle spielt (Brady, Stanbury, Wyngaarden, 1983). Diese Vermutung wurde mithilfe des Mausmodells BALB/c, welches damals wie heute für die NPC-Forschung Verwendung findet, bestätigt (Pentchev et al., 1984). Anhand der jeweils auslösenden Genmutation auf dem NPC1- oder dem NPC2-Gen wurde der Subtyp C in den mit 95% führenden Typ 1 und den selteneren Typ 2 unterteilt (Park et al., 2003).

1.1.2 Pathogenese

Während der Morbus Niemann-Pick Typ A und Typ B durch einen Defekt der Sphingomyelinase verursacht werden, liegt beim Typ C eine Störung des intrazellulären Lipidtransportes vor, die eine fehlerhafte Verteilung und Zirkulation von Cholesterin bedingt (Grau et al., 2003; Patterson, 2001). Steinberg et. al (1994) und Vanier et. al (1996) zeigten, dass zwei krankheitsverursachende Gene für den Typ C existieren (Steinberg, Ward, & Fenson, 1994; Vanier et. al 1996). Das in über 95% der Fälle krankheitsverursachende NPC1-Gen (Millat et al., 2001) ist auf dem Chromosom 18q11 lokalisiert und codiert für ein 1278 Aminosäuren umfassendes membranständiges Glykoprotein (Carstea et al., 1997; Morris et al., 1999). Mit seiner Masse von 142 kD (Carstea et al., 1997) verbleibt es in den späten Endosomen und interagiert vorübergehend mit Lysosomen und dem trans-Golgi-Netzwerk (Higgins et. al, 1999; Neufeld et al., 1999). Des Weiteren fungiert NPC1 als transmembranöse Pumpe für den Transport lipophiler Substanzen (Grau et al., 2003; Liscum, 2000; Lossos et al., 1997). Sequentiell bestehen Ähnlichkeiten zu wichtigen Bestandteilen des Cholesterin-Stoffwechsels wie beispielsweise zur HMG-CoA-Reduktase (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA), dem SCREBP-cleavage-activating-protein (SCAP), dem PATCHED-Rezeptor (Carstea et al., 1997; Davies & Ioannou, 2000; Watari et al., 1999) und dem Protein NPC1L1, welches das Ziel des Cholesterin-Absorptions-Hemmer „ezetimib“ darstellt (Altmann et al., 2004; Temel et al., 2007). Im ZNS wird das NPC1-Protein vorwiegend in astrozytären Fortsätzen exprimiert, wodurch eine neuronale Degeneration bei seinem Defekt nachvollziehbar erscheint (Grau et al., 2003; Patterson, 2001). Derzeit sind bereits über 200 krankheitsverursachende Mutationen im NPC1-Gen identifiziert worden (Fernandez-Valero et al., 2005; Runz et al., 2008). Deutlich seltener liegt bei den verbleibenden 5% ein NPC2-Gendefekt auf dem Chromosom 14q.24.3 vor. Das NPC2-Gen codiert für ein kleines lösliches Glykoprotein, welches ubiquitär exprimiert wird und lysosomales Cholesterin bindet (Grau et al., 2003; Millat et al., 2001; Naureckiene et al., 2000). Zu finden ist es unter anderem in sekretorischen Flüssigkeiten wie der Gallensäure, Muttermilch oder Blutplasma (Klein et al., 2006; Larsen et al., 1997). Patienten mit NPC2-Mutationen können weder klinisch noch biochemisch sicher von solchen mit NPC1-Mutationen unterschieden werden (Grau et al., 2003). Dies wiederum legt nahe, dass die Proteine NPC1 und NPC2 hintereinandergeschaltet oder zusammen in einem metabolischen Weg agieren (Carstea et al., 1997; Vanier et al., 1996). Physiologischerweise transportieren LDL-Partikel (low density lipoprotein) Cholesterin und Cholesterinester von der Leber zu extrahepatischen Geweben, wo sie den LDL-Rezeptor binden und mittels Endozytose aufgenommen werden. Im nächsten Schritt werden die endozytierten LDL-Partikel in Lysosomen abgebaut und die enthaltenen Cholesterinester durch eine saure, lysosomale Lipase (LAL) in Cholesterin und freie Fettsäuren hydrolysiert (Brown et al., 1986; Löffler, 2014). In gesunden Zellen wird das nun freie Cholesterin mittels der Proteine NPC1 (Carstea et al., 1997) und NPC2 (Naureckiene et al., 2000) zur Plasmamembran, dem endoplasmatischen Retikulum oder

anderen Organellen transportiert (Mesmin & Maxfield, 2009), wo es entweder die HMG-CoA-Reduktase und damit die Cholesterinbiosynthese hemmt oder die Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) aktiviert und somit die Veresterung und Speicherung von Cholesterin bedingt (Löffler, 2014). Im ZNS erfolgt die Cholesterinsynthese lokal durch Oligodendrozyten oder Astrozyten, da die transportierenden Lipoproteine die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. (Vance et al., 2005). Beim NPC ist sowohl der oben beschriebene intrazelluläre Transport als auch die Freisetzung von endozytierten Cholesterins gestört, was auch in Studien von Pentchev et. al (1995) gezeigt wurde. Diverse Forschungsarbeiten beschäftigen sich mit der genauen Funktionsweise der Proteine NPC1 und NPC2 um die Ätiologie der Lipidakkumulation genauestens darzustellen (Deffieu & Pfeffer, 2011; Rosenbaum & Maxfield, 2011). Diese zeigten, dass freies Cholesterin vom löslichen, lysosomalen NPC2 gebunden und zum membranständigen NPC1 transportiert wird. Hier erfolgt die Freisetzung des Cholesterols in das Zytosol und steht danach für den Weitertransport zu Verfügung (Deffieu & Pfeffer, 2011; Rosenbaum & Maxfield, 2011) (**Abbildung 1**). Man vermutet, dass NPC1- und NPC2- Mutationen den beschriebenen Mechanismus stören und neuronale Lipidspeicherungen, Megadendritenbildungen, neuroinflammatorische Prozesse und letztlich eine neuroaxonale Dystrophie zur Folge haben (Patterson, 2001).

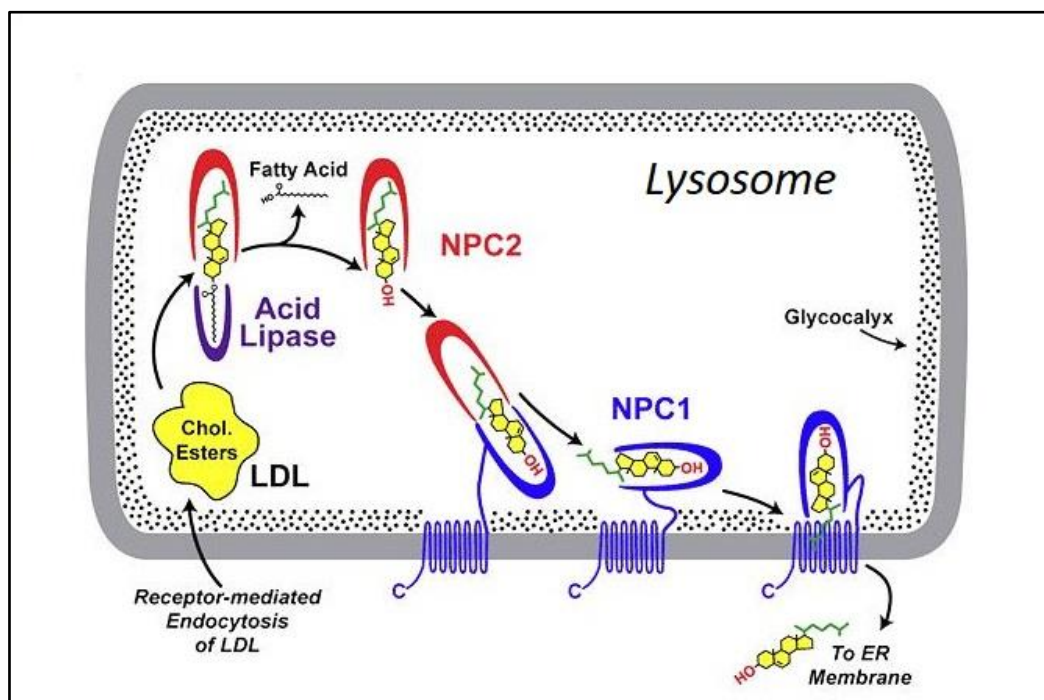


Abbildung 1: Physiologische Funktionsweise der Proteine NPC1 und NPC2 im Lysosomen

Cholesterin wird über die LAL (Acid Lipase) freigesetzt und an das lösliche NPC2 gebunden. Anschließend erfolgt der Transport zum membranständigen NPC1 und die Freisetzung des Cholesterins in das Zytosol, entnommen von:

Genomeyear, 2020

Im Gegensatz zu anderen Lipidspeichkrankheiten, akkumulieren beim NPC neben Cholesterol auch diverse andere Lipide, wie Sphingosin, Sphingomyelin und unterschiedliche Glykosphingolipide wie GM2- und GM3-Ganglioside (Lloyd-Evans et al., 2008; Vanier, 2010). Glykolipide machen beim NPC den Hauptanteil der Lipidablagerungen im Gehirn aus, sodass sich die Frage stellt, ob NPC1 und NPC2 ebenfalls für den Transport anderer lysosomaler Fracht als Cholesterin zuständig sein könnten (Vanier, 2010). Im Gegensatz zum Hirngewebe, kommt es in betroffenen Organen wie der Milz oder der Leber hauptsächlich zu Sphingosin- und Cholesterol-Anreicherungen. Bei NPC-Patienten zeigen sich diese vor allem in der Milz sehr ausgeprägt (Vanier, 2010). Die genaue Funktion der NPC1- und NPC2-Proteine und der Mechanismus, der letztlich die Lipidablagerungen bedingt, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es werden eine Reihe weitere Faktoren diskutiert, die eventuell an der Pathogenese beteiligt sind (Vanier, 2010). Vermutet wird, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Progression des Morbus Niemann-Pick besitzt, da er in verschiedenen NPC-Zellmodellen (Zampieri et al., 2009) und -Mauslinien beobachtet wurde (Smith et al., 2009). Dieser erscheint besonders relevant, da reaktive Sauerstoffverbindungen den Tyrosinkinase-ABL1/p73 regulierten Apoptoseprozess aktivieren und damit die fortschreitende Neurodegeneration beim NPC erklären können (Alvarez et al., 2004). Leberproben von NPC-Mäusen zeigten außerdem erhöhte Marker für oxidativen Stress, wie Carbonylproteine und verringertes reduziertes Glutathion (GSH), das zu den wichtigsten körpereigenen Antioxidanzien zählt (Vázquez et al., 2011). Bei NPC-Patienten konnte zudem eine verminderte Coenzym Q10-Serumkonzentration beobachtet werden, die ebenfalls mit einer reduzierten antioxidativen Abwehr einhergeht (Fu et al., 2010). Im Mausmodell zeigte sich, noch vor der klinischen Manifestation, ein Anstieg von Cholesterinoxidationsprodukten, dem sogenannten Oxysterol. Es dient auch heute als sensitiver und spezifischer Biomarker bei der Diagnostik und Therapie des NPC1 (Porter et al., 2010). Als Verursacher des oxidativen Stresses werden funktionsgestörte Mitochondrien und nachfolgender ATP-Mangel (Vázquez et al., 2012) sowie veränderte peroxisomale Enzyme, wie die Katalase und Enzyme der β -Oxidation diskutiert (Schedin et al., 1997). Ein weiterer möglicher Grund für die Entstehung von Sauerstoffradikalen ist die intrazelluläre Akkumulation von Vitamin E und der damit verbundenen reduzierten Bioverfügbarkeit. Vitamin E ist, neben dem GSH, eines der wichtigsten Antioxidanzien, das mit freien Radikalen reagiert und diese inaktiviert (Burton & Traber, 1990; Yévenes et al., 2012). Überlegt wurde auch, ob Sphingosin-Ablagerungen einen primären Trigger der Krankheit darstellen, indem sie den lysosomalen Calcium-Haushalt stören und letztlich sekundäre Sphingolipid- und Cholesterinspeicherungen bedingen. Damit wäre die Calcium-Homöostase ein neues Target für therapeutische Interventionen (Lloyd-Evans et al., 2008; Lloyd-Evans & Platt, 2010).

1.1.3 Diagnose

In der Regel ergeben beim Morbus Niemann Pick weder Laboruntersuchungen noch bildgebende - oder elektrophysiologische Untersuchungsmethoden spezifische Befunde. Gelegentlich zeigen sich unspezifische Marklagerveränderungen und Kleinhirnatrophien im CT oder MRT und Laborbefunde können durch Hypersplenismus oder einen cholestatischen Ikterus auffällig werden (Grau et al., 2003). Häufig wird der NPC aufgrund seiner ziemlich unspezifischen Symptome erst nach unzähligen Fehldiagnosen festgestellt (Vanier, 2010). Besteht ein klinischer Verdacht auf NPC, ist es zunächst sinnvoll, Knochenmarksausstriche auf das Vorhandensein von Speicherzellen zu untersuchen (Bornemann & Harzer, 2015). Dabei handelt es sich um zytoplasmatische Einschlusskörperchen, die durch die Giemsa-Färbung blau gefärbt wurden und in Form von „seeblassen Histiozyten—oder hellen vakuolisierten Zellen auftauchen (Harzer et al., 1978). Allerdings finden sich diese auch bei anderen Speicherkrankheiten und sind somit nicht spezifisch (Grau et al., 2003). Zur sicheren Diagnose eines NPC dient der in Speziallaboratorien durchgeführte Filipintest, bei dem mithilfe von Filipin Fibroblastenkulturen angefärbt werden (Vanier et al., 2016). Mittels des cholesterinspezifischen Fluoreszenzfarbstoffes lassen sich perinukleäre Vesikel mit stark fluoreszierender Granula als Ausdruck der mit Cholesterin überladenen Lysosomen darstellen (Patterson, 2001). Bei etwa 86% der Fälle, zeigt sich ein sogenannter klassischer Phänotyp mit intensiver Fluoreszenz, bei 7% der Fälle ein intermediärer Phänotyp mit mäßiger Fluoreszenz und bei weiteren 7% ein varianter Phänotyp mit milder Fluoreszenz (Vanier et al., 1991). Betroffene mit einem varianten biochemischen Phänotyp haben nur eine moderat erhöhte lysosomale Cholesterineinlagerung, was die Diagnosestellung wesentlich erschwert (Vanier et al., 1991). Bei grenzwertigen Ergebnissen, sollte zunächst eine Mutationsanalyse der Gene NPC1 und NPC2 durchgeführt werden und bei weiteren Unklarheiten histo- und biochemische Untersuchungen aus einer Leberbiopsie erwogen werden (Grau et al., 2003; Patterson, 2001). In den vergangenen Jahren erbrachten Fortschritte der Massenspektrometrie und diverse Studien den Nachweis weiterer erhöhter sensitiver Plasma-Biomarker beim Morbus Niemann Pick (Vanier et al., 2016). Porter et al. (2010) zeigten, dass das Oxidationsprodukt von Cholesterin, Oxysterol, wie oben beschrieben als biochemischer Marker zur Diagnostik und Therapiemonitoring des NPC genutzt werden kann. Des Weiteren ist es möglich die Chitotriosidase-Aktivität im Plasma zu bestimmen, welche bei erhöhten Werten einen potentiellen Indikator für lysosomale Speicherkrankheiten inklusive des NPC-A, -B und -C darstellt (Ries et al., 2006). Jüngste Forschungsarbeiten zeigen auch, dass NPC-Erkrankte und Betroffene weiterer Speicherkrankheiten ein erhöhtes Plasma-Lysophingomyelin (SPC) aufweisen (Welford et al., 2014). Darüber hinaus wird von einem krankheitsspezifischen SPC-Derivat, dem sogenannten Lysophingomyelin-509 (lyso-SM-509) berichtet, das bei allen NPC-Formen erhöht vorliegt (Giese et al., 2015). Damit eignet es sich ausgezeichnet, um tatsächlich Kranke von Kontrollen zu unterscheiden (Vanier et al., 2016). Aktuell erfolgt die Bestimmung der Lysophingolipid-Spiegel mithilfe der Flüssigchromatografie oder der Massenspektrometrie. Beide Verfahren besitzen, im Gegensatz zum Filipin-Test, die Vorteile der

stärkeren Durchflussleistung und einer höheren Verarbeitungsmenge, bei gleichzeitig geringeren Kosten (Vanier et al., 2016). Ein weiterer Artikel beschreibt zwei Gallensäuremetaboliten, NPCBA1 und NPCBA2, die bevorzugt bei NPC-Patienten akkumulieren und im Vergleich zu den Kontrollen in 40-facher (NPCBA1) beziehungsweise 10-facher (NBCBA2) Plasmakonzentration vorliegen (Mazzacuva et al., 2016). Aktuelle Daten zu den Gallensäuremetaboliten scheinen vielsprechend. Besonders NBCBA2 soll sich als potentieller Biomarker eignen und könnte in Zukunft die Oxysterol-Bestimmung als Goldstandard ablösen (Vanier et al., 2016). Werden die geläufigen Tests in der richtigen Kombination verwendet, kann in den meisten Fällen eine korrekte Diagnose gestellt werden. Bei einigen Patienten, deren genetische und biochemische Marker keine klare Antwort geben, ist das Stellen einer richtigen Diagnose auch heute noch eine große Herausforderung (Vanier et al., 2016).

1.1.4 Klinischer Verlauf

Der Krankheitsbeginn variiert zwischen dem Neugeborenenalter und der sechsten Lebensdekade. Früherkrankte Neugeborene entwickeln häufig einen pathologischen Ikterus mit Cholestase und einer Riesenzellhepatitis (Kohlschütter, 2015). Im frühen Kindesalter fallen dann eine zentrale Hypotonie, verzögerte motorische Entwicklung und später auch abnehmende Schulleistungen auf (Garver, Jelinek, et al., 2007; Mengel et al., 2012). Ebenso kann sich eine Hepatosplenomegalie durch ein ausladendes Abdomen bemerkbar machen (Beck & Lackner, 2007; Mengel et al., 2012). Im weiteren Verlauf zeigen sich neurologische Symptome wie Krämpfe, Pyramidenbahnzeichen und extrapyramidale Störungen wie Tremor oder Dystonie, während die periphere Nerven kaum betroffen sind (Kohlschütter, 2015). Als wichtigstes Frühzeichen gilt die supranukleäre vertikale Blickparese (Solomon, Winkelman, Zee, Gray, 2005). Verhaltensänderungen mit Konzentrations- und Impulskontrollstörungen oder Ängsten können ebenfalls Folge des neurodegenerativen Prozesses sein (Mengel et al., 2012). In der Bildgebung lassen sich im Klein- und Großhirn Atrophien erkennen, die wiederum Symptome wie Schluckstörungen, Dysarthrie und Dysphagie erklären (Kohlschütter, 2015). Bei einzelnen Erkrankten treten die Symptome erst im Erwachsenenalter auf. Meist finden sich Psychosen oder eine isolierte Demenzsymptomatik (Grau et al., 2003; Shulman et al., 1995). Marie Vanier (2010) erstellte ein zusammenfassendes Schema, das den oben beschriebenen neurodegenerativen und systemischen Verlauf der Lipidspeicherkrankheit NPC in Abhängigkeit vom Patientenalter auffasst und darstellt (Vanier, 2010). Sie unterteilte die Erkrankung anhand des erstmaligen Auftretens von Symptomen in vier Unterformen: die frühe infantile Form, die späte infantile Form, die juvenile Form und die adulte Form (**Abbildung 2**). Die frühe infantile Form zeigt die ersten neurologischen Symptome wie zentrale Hypotonie und verzögerte motorische Entwicklung im Alter von 1 bis 2 Jahren. Bei der späten infantilen Form, im Alter von 3 bis 5 Jahren, kommt es aufgrund von zunehmender Ungeschicklichkeit und Gangunsicherheit zu wiederholten Stürzen. Ferner zeigen sich auch Kataplexie und Sprachentwicklungsstörungen. Die häufigste Form der Erkrankung ist die juvenile Form, die im Alter von 6 bis 15 Jahren initial durch supranukleäre Blickparesen auffällt.

Hinzu kommen Lernprobleme, Konzentrationsstörungen und Ataxie. Die adulte Form gleicht der juvenilen in abgemilderter Symptomatik. Ein Drittel der Patienten wird zunächst durch Psychosen, Halluzinationen oder paranoiden Gedanken auffällig (Vanier, 2010) oder entwickelt eine isolierte Demenzsymptomatik (Grau et al., 2003). Diese Symptome können jahrelang ohne weitere neurologisch-motorische Ausfälle vorliegen. Allerdings kommen im weiteren Krankheitsverlauf, parallel zu den anderen Verlaufsformen, ebenfalls Symptome wie Ataxie, Blickparesen und andere kognitive Probleme hinzu (Vanier, 2010). Angaben zum Krankheitsprogress und der verbleibenden Lebenszeit variieren beim Morbus Niemann Pick stark, da sie wesentlich vom Erkrankungsalter und der Symptomschwere abhängig sind. Prognosen zur individuellen Lebenserwartung und der damit einhergehenden Lebensqualität sind dementsprechend schwer zu formulieren (Mercè Pineda et al., 2018). Fast alle NPC-Patienten versterben vorzeitig. Es sind nur wenige Fälle bekannt, bei denen sich keinerlei neurologische Symptomatik entwickelte (Greenberg et al., 2015) oder die sechzigste Lebensdekade überschritten werden konnte (Trendelenburg et al., 2006). Die letztendlich zum Tode führenden Umstände sind in der Vergangenheit häufig nicht konkret dokumentiert worden. Zwei NPC-Patienten-Kohorten zeigten allerdings, dass in circa 60% der Fälle eine Bronchopneumonie, infolge von Nahrungs- oder Flüssigkeitsaspiration, für ein vorzeitiges Ableben verantwortlich ist (Jan & Camfield, 1998; Kelly et al., 1993). Eine Dysphagie konnte bei circa 80% der NPC-Patienten nachgewiesen werden (Garver, Francis, et al., 2007; Patterson et al., 2013) und stellt den häufigsten Grund für eine Aspirationspneumonie dar. Die Dysphagie ist damit einer der größten Risikofaktoren für eine verfrühte Patientenmortalität (Walterfang et al., 2012).

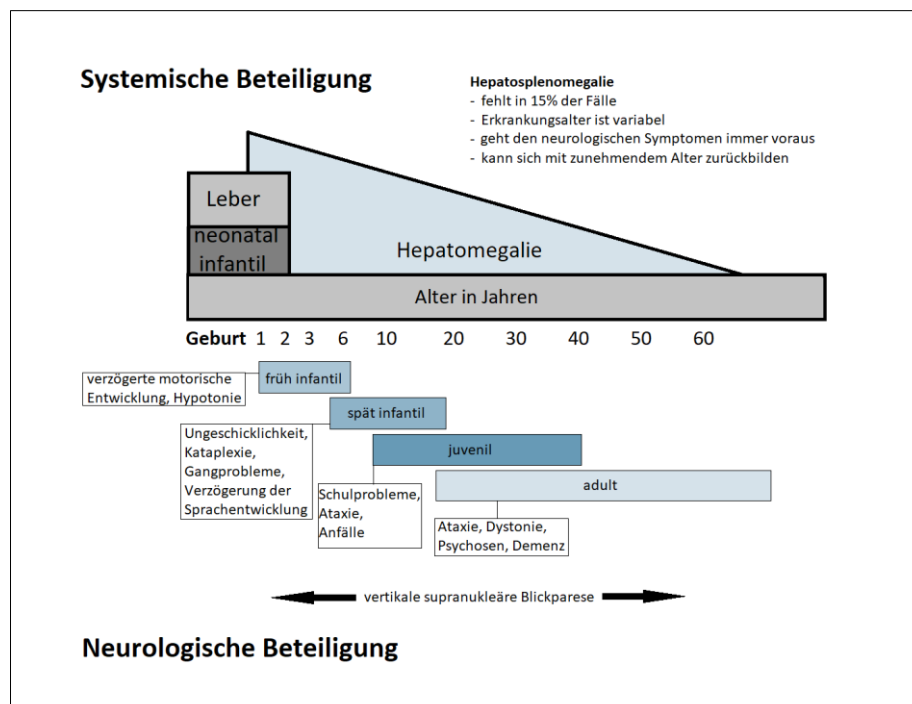
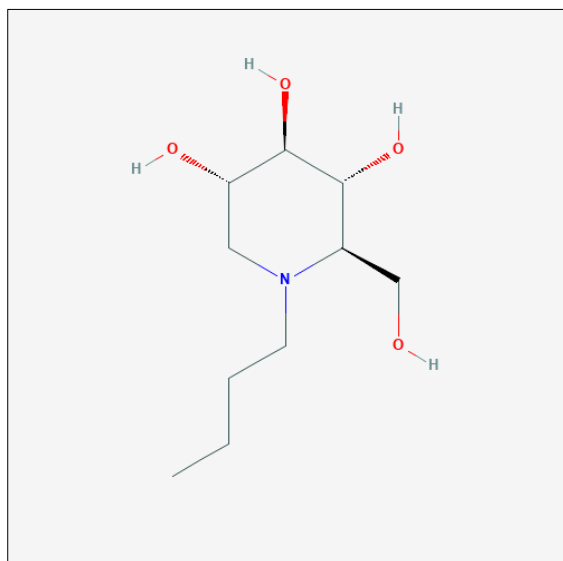


Abbildung 2: Schema zum zeitlichen Verlauf und der klinischen Symptomatik vom Morbus Niemann Pick Typ C
(modifiziert nach Vanier 2010)

1.2 Therapie

Bis heute handelt es sich beim Morbus Niemann Pick Typ C um eine unheilbare Erkrankung, bei der die symptomatische Therapie und die Verzögerung des Krankheitsprozesses vordergründig sind. Während Ergo-, Logo- oder Physiotherapie den Erhalt der Sprache und motorischer Fähigkeiten unterstützen, können Symptome wie Krampfanfälle, Depressionen oder Wahnvorstellungen durch unterschiedliche Medikamente gelindert werden. Seit Jahren werden diverse Therapiestrategien untersucht, die möglicherweise die Schwere des Morbus Niemann Pick beeinflussen oder lindern können. Die Substrate-Reduction-Therapy (SRT) stellt einen Behandlungsansatz von lysosomalen Speicherkrankheiten dar, indem sie die Synthese der eingeschränkt abbaubaren Speichersubstanzen vermindert und damit der krankheitsdefinierenden Lipidakkumulation entgegenwirkt. (Mengel et al., 2012; Rosenbaum & Maxfield, 2011). Studien zeigen zwar, dass mithilfe von Statinen, cholesterinärmer Diät oder Medikamenten wie Ezetimib die Leberfunktion verbessert werden kann, die neurologische Degeneration aber weiter fortschreitet und das klinische Outcome nicht verbessert werden kann (Beltroy et al., 2007; Rosenbaum & Maxfield, 2011). Im Zentrum verschiedener Forschungsarbeiten stehen daher drei weitere Medikamente: Miglustat, Cyclodextrin (HP β CD) und Allopregnanolon, von denen bisher lediglich Miglustat seine Zulassung erhalten hat. Seit 2009 wird es als Therapeutikum zur palliativen Therapie des Morbus Niemann Pick eingesetzt und konnte seine Wirksamkeit durch die wachsenden klinische Erfahrung und seinen vermehrten Einsatz unter Beweis stellen (Pineda et al., 2018). Für Miglustat existieren neben zahlreicher klinischer Daten auch unzählige Ergebnisse aus Tierversuchsreihen, die einen krankheitsmodifizierenden Benefit beobachten lassen (Nadjar et al., 2018; Mercedes Pineda et al., 2019; Sedel et al., 2016). Im Tiermodell lassen sich gleichartige positive Effekte beim Medikament HP β CD beobachten, welches mittlerweile auch in einzelnen Behandlungsstudien am Menschen getestet wird (Ory et al., 2017; Tamura & Yui, 2018). Dem dritten, im Fokus der NPC-Therapie stehendem Medikament, Allopregnanolon, konnte in diversen präklinischen Studien die Rolle als Proliferationsfaktor für neuronale Stammzellen und Oligodendrozyten zugesprochen werden (Hernandez & Brinton, 2019). Damit rückt es ebenfalls in das Zentrum der Therapiemöglichkeiten von neurodegenerativen Erkrankungen wie NPC oder Alzheimer (Griffin et al., 2004; Wang et al., 2010). Plausibel erscheint eine Kombination der Medikamente Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolone, als sogenannte „Substrate-Reduction—und „By-Product-Replacement-Therapy— (SRT/BRT). Diese wurde bereits im Tiermodell angewandt und als wirksam erwiesen (Davidson et al., 2009). Bei den untersuchten Tieren zeigten sich eine Abnahme der GM2- und GM3-Gangliosidablagerungen, eine verminderte Purkinjezelldegeneration und eine erhöhte Lebenserwartung. Die neurologische Symptomatik trat im Vergleich zu den Kontrolltieren erst verspätet auf (Davidson et al., 2009).

1.2.1 Miglustat (N-Butyldeoxynojirimycin) C₁₀H₂₁NO₄



**Abbildung 3: 2D-Struktur von Miglustat
(N-butyldeoxynojirimycin)**

Entnommen von: PubChem – National Center for
Biotechnology Information 2020,
PubChemID: 51634

Die Zulassung von Miglustat erfolgte im Jahr 2002 unter dem Handelsnamen Zavesca® (Actelion Pharmaceuticals, Allschwil, Schweiz). Zu diesem Zeitpunkt durfte es lediglich als Therapeutikum des Morbus Gaucher Typ 1 verwendet werden. Die European Medicines Agency erweiterte 2009 den Indikationsrahmen auf die Behandlung von an NPC erkrankten pädiatrischen und erwachsenen Patienten (European Medicines Agency, 2020). Der Wirkstoff Miglustat ist ein kleiner alkylierter Iminozucker, der als reversibler Inhibitor der Glucosylceramid-Synthase (GCS) fungiert. Ein Enzym, welches normalerweise den ersten Schritt der Glycosphingolipid-Synthese katalysiert und damit wesentlich zum Voranschreiten der krankheitsdefinierenden Lipidakkumulation

beiträgt (Plattm et al., 1994; Schlegel, 2017). Die physikochemischen Fähigkeiten von Miglustat erlauben eine extravaskuläre Verteilung und die notwendige Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, sodass eine zentrale Wirkung gewährleistet ist (Treiber et al., 2008). Untersuchungen an B-Lymphozyten von NPC-Patienten zeigen, dass unter Miglustat Glycosphingolipid-Spiegel sanken, die pathologische Lipidakkumulation nachließ und der Lipidtransport normalisiert werden konnte. Diese Beobachtungen legen nahe, dass durch eine Miglustat-Therapie möglicherweise auch potentiell neurotoxische GM2- und GM3, Lactosyl- oder Glucosylceramide reduziert werden könnten (Lachmann et al., 2004). Darüber hinaus zeigen diverse retro- und prospektive Studien, dass Miglustat ein verspätetes Einsetzen der Krankheit bedingt, den Progress verlangsamt und die Überlebenszeit verlängert (Santos-lozano et al., 2015; Zervas, Dobrenis, et al., 2001; Zervas, Somers, et al., 2001). In behandelten NPC-Katzen konnte außerdem ein prolongiertes Überleben von Purkinje Zellen und eine verbesserte neurologische Klinik beobachtet werden (Stein et al., 2012). Wie bereits bei der Pathogenese erwähnt, stören lysosomale Sphingosin-Ablagerungen den intrazellulären Calcium-Haushalt, indem sie die lysosomale Calciumaufnahme verhindern. Studien zeigen, dass Miglustat einen positiven Einfluss auf die intrazellulären Calcium-Homöostase hat, indem es die Sphingosin-Akkumulation reduziert (Lloyd-Evans et al., 2003, 2008; Lloyd-Evans & Platt, 2011). Andere Forschungsarbeiten weisen zusätzlich nach, dass sich die Zahl der Calcium-bindenden Proteine in Kleinhirnneuronen unter einer Miglustat-Therapie reduziert. Diese Beobachtung macht die Regulierung des Calciumhaushalts, als therapeutischen Effekt von Miglustat, noch wahrscheinlicher (Bradbury et al., 2016). Im letzten Jahrzehnt wurde ein breites Spektrum an Messmethoden entwickelt,

um den therapeutischen Effekt von Miglustat zu bewerten (Pineda et al., 2018). Beispielsweise zeigt eine Fallstudie um drei französische erwachsene NPC-Patienten einen anhaltenden Abfall der hirnspezifischen Cholin/Kreatin-Ratio (Cho/Kr) während einer zwei Jahre andauernden Miglustat-Therapie. Cho/Kr ist ein geläufiger Marker für neurodegenerative Prozesse im Gehirn. Er wird mithilfe der Magnetresonanztomographie bestimmt und könnte so als nicht invasiver Marker dem Therapiemonitoring von Miglustat dienen (Galanaud et al., 2009; Sedel et al., 2016). Eine Metaanalyse sämtlicher Daten zu den Therapieeffekten einer Miglustatbehandlung beim Morbus Niemann-Pick zeigt, dass unbehandelte NPC-Patienten (N=97) im Gegensatz zu den behandelten NPC-Patienten (N=90) eine größere Todesrate innerhalb einer 5-Jahres-Periode zu verbuchen haben. Während in der behandelten Gruppe nur 3 Patienten verstarben, waren es in der unbehandelten Gruppe 74 Patienten (Walterfang et al., 2012). Die Kaplan-Meier Schätzung zeigt, dass es sich dabei um einen statistisch signifikanten Unterschied handelt ($p = 0.044$) und untermauert damit die Wirksamkeit von Miglustat (Pineda et al., 2018). In der Klinik sollte eine Behandlung begonnen werden, sobald die Patienten neurologische Symptome aufweisen. Auch Betroffene mit fehlender neurologischer Manifestation, aber entsprechender Familienanamnese und passendem Krankheitsverlauf, können eine Therapie zum Zeitpunkt der voraussichtlichen Manifestation erhalten (Patterson et al., 2012). Mit einem krankheitsmodifizierenden Benefit ist beim frühen-juvenilen Typ frühestens nach 6-12 Monaten ab Therapiebeginn zu rechnen. Beim späten-adulten Typ kann sich dieser auch erst nach über 2 Jahren zeigen (Walterfang et al., 2012). Wie bei jeder anderen Medikation ist die Verträglichkeit von Miglustat interindividuell. Zu den häufigsten bekannten Nebenwirkungen gehören Diarrhoe, Flatulenzen, Bauchschmerzen und allgemeines Unwohlsein (Brand et al., 2015; Champion et al., 2010). Gastrointestinale Unverträglichkeiten können besonders zu Beginn der Therapie die Patienten-Compliance herabsetzen, sodass die Therapie engmaschig kontrolliert werden sollte (Belmatoug et al., 2011). Ein vorsichtiges Aufтитrieren zu Behandlungsbeginn, Ernährungsumstellungen oder spezielle Diätpläne können Nebenwirkungen minimieren oder gar verhindern (Belmatoug et al., 2011). In seltenen Fällen wurden von der Entstehung einer peripheren Neuropathie berichtet. Diese wurde allerdings nur bei Morbus Gaucher-Patienten in der klinischen Testphase von Miglustat beobachtet (Cox et al., 2000). Bei über der Hälfte der therapierten Patienten zeigt sich initial ein transients physiologischer Tremor, der in der Regel einige Monate später von selbst verschwindet (Cox et al., 2000). Schlegel et al. (2016) beobachteten außerdem, dass Miglustat-therapierte Wildtypmäuse sowohl reduzierte Hirngewichte als auch eine verschlechterte räumliche Orientierung gegenüber ihren scheintherapierten Kontrolltieren aufweisen. Des Weiteren konnten moderat verminderte Thrombozytenzahlen beobachtet werden, die eine Gerinnungsdiagnostik zu Beginn einer jeden Therapie notwendig machen (European Medicines Agency, 2020). Die Ausscheidung von Miglustat erfolgt hauptsächlich über die Nieren, sodass neben einem engmaschigen Therapiemonitoring, die regelmäßige Kontrolle der Nierenparameter angezeigt sind (Treiber et al., 2008). Als Folge der

unzähligen potentiellen Nebenwirkungen besitzt Miglustat nach wie vor eine strenge Indikationsstellung (Vanier, 2010).

1.2.2 Allopregnanolon (Pregnan-3 α -ol-20-one) C₂₁H₃₄O₂

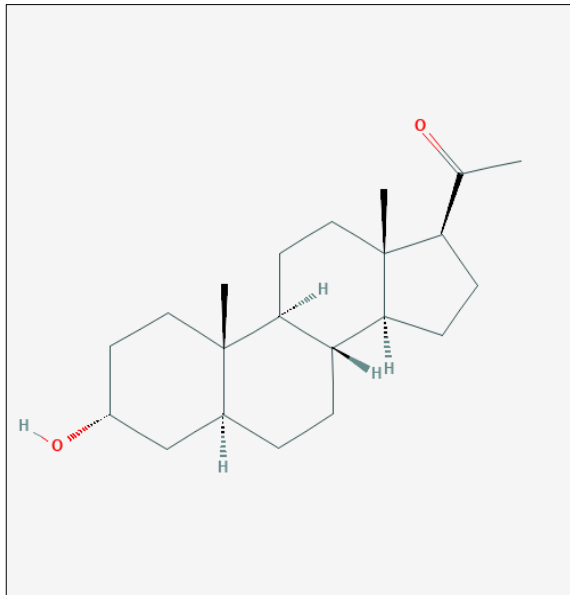


Abbildung 4: 2D-Struktur von Allopregnanolone (Allopregnan-3 α -ol-20-one)

Entnommen von: PubChem – National Center for Biotechnology Information 2020,
PubChemID: 92786

Als zweites therapeutisches Agens wurde Allopregnanolon getestet. Ein Neurosteroid, das bei NPC erkrankten Mäusen, im Vergleich zu ihren Kontrolltieren, in deutlich reduzierter Zahl vorliegt. (Griffin et al., 2004). Es handelt sich dabei um einen neuroaktiven, reduzierten Metaboliten des körpereigenen Hormons Progesteron, der als Barbiturat-ähnlicher Modulator der zentralen GABA-Rezeptor (Gamma-aminobutyric acid Rezeptors) eine Reihe von Verhaltensweisen und Stressantworten modifizieren kann (PubChem, U.S. National Library of Medicine 2020). Neurosteroid, wie Allopregnanolon, können durch Konversion peripher gebildeter Steroide oder de novo von Gliazellen synthetisiert werden (Agis-Balboa et al., 2006; Mellon & Griffin, 2002).

Physiologischerweise regulieren sie das neuronale

Wachstum, die zentrale Zelldifferenzierung und die Modulation von Neurotransmitter-Rezeptoren (Griffin et al., 2004). Jüngste Studien zeigen außerdem, dass Allopregnanolon einen Proliferationsfaktor für neuronale Stammzellen darstellt und so zu einer vermehrten Zellneubildung beiträgt (Hernandez & Brinton, 2019). Ergebnisse wie diese, verdeutlichen die essentielle Rolle von Allopregnanolon für ein intaktes Nervensystem. Bei NPC erkrankten Mäusen ist dieser Metabolit vermindert oder nicht vorhanden, sodass der Versuch unternommen wurde, das Neurosteroid Allopregnanolon extern zuzuführen (Davidson et al., 2009). Die dafür genutzte therapeutische Methode wird als „By-Product-Replacement-Therapy“ oder „BRT“ bezeichnet, da sie reduzierte oder fehlende Substrate ersetzen soll, die für die normale Zellfunktion benötigt werden (Davidson et al., 2009; Walkley, 2007). In diversen Studien erfolgte die Applikation von Allopregnanolon gelöst im Trägerstoff 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) und ließ einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf beobachten. Behandelte NPC-Mäuse zeigen im Vergleich zu Kontrolltieren verminderte Gangliosid-Akkumulationen, eine verspätete Krankheitsmanifestation und verlängerte Überlebenszeiten (Davidson et al., 2009). Andere Forschungsarbeiten lassen auch abnehmende Cholesteroll-Akkumulationen und reduzierte neuronale Inflammation beobachten. Zusätzlich zeigt sich eine verbesserte Myelinisierung (Liao et al., 2009). Trotz der unzähligen nachgewiesenen positiven

Effekte von Allopregnanolon bei neurodegenerativen Prozessen (Hernandez & Brinton, 2019; Karout et al., 2016; M. Meyer et al., 2017), wird der krankheitsmodifizierende Benefit der Kombinationstherapie von Allopregnanolon und HP β CD (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrins) beim NPC, insbesondere auf HP β CD zurückgeführt (Davidson et al., 2009). Allopregnanolon gilt trotz dessen weiterhin als potentes Therapeutikum neurodegenerativer Erkrankungen, wie Daten präklinischer Studien zeigen (Hernandez & Brinton, 2019). Verminderte Allopregnanolon-Spiegel lassen sich nicht nur beim Morbus Niemann-Pick beobachten, sondern werden auch mit der Entstehung von Depressionen, Angststörungen und der Alzheimer-Erkrankung assoziiert (Tsutsui & Haraguchi, 2016). Auch als Brexanolone bekannt, wird der Wirkstoff Allopregnanolon seit März 2019 unter dem Handelsnamen Zulresso® vermarktet und für die Behandlung der postpartalen Depression eingesetzt (Fala, n.d.; Powell et al., 2020). Eine Zulassung von Allopregnanolon für die Behandlung des Morbus Niemann-Pick Typ C besteht derweil noch nicht.

1.2.3 Cyclodextrin (2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin) C₅₄H₁₀₂O₃₉

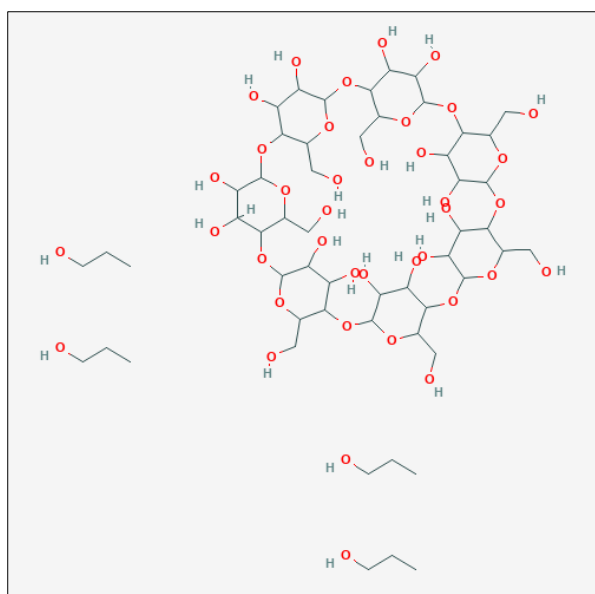


Abbildung 5: 2D-Struktur von HP β CD

(2-hydroxypropyl- β -HP β CD)

Entnommen von: PubChem – National Center for
Biotechnology Information 2020,
PubChemID: 44134771

Cyclodextrin (HP β CD, 2-hydroxypropyl- β -HP β CD) ist ein zyklisches Oligosaccharid, das aus sieben β -(1-4)-Glucopyranose-Einheiten besteht und für den kontrollierten Transport von organischen, anorganischen, biologischen oder pharmazeutischen Molekülen genutzt wird (Saha, Roy, Roy, & Roy, 2016, PubChem 2020). Während die hydrophobe Innenseite des Moleküls eine sehr hohe Affinität zu Sterolen besitzt, bildet der Zuckerring mit den Hydroxypropyl-Gruppen die hydrophile Außenseite (Irie et al., 1992; Williams III et al., 1998). Seine physikochemischen Eigenschaften erlauben die Bildung von Inklusionskomplexen mit diversen Gastsubstanzen. Deren unpolare Teil wird in das hydrophobe Innere aufgenommen (Saha et al., 2016) und ermöglicht

damit auch den Transport lipophiler Stoffe. Der genaue Wirkungsmechanismus von HP β CD ist nicht vollständig geklärt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Sekretion des endo- oder lysosomalen Inhalts über den endosomalen Calciumkanal MCOLN-1 (Mucolipin-1), FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain containing 1), einem AP1-Adapter (Adapter-Protein-1) und seinem Partner Gadkin gesteuert wird (Vacca et al., 2019). Man nimmt an, dass HP β CD über eine Modifikation dieser Elemente die endo- und lysosomale Sekretion triggert und so die Cholesterollast

In Niemann-Pick-Typ-C-Zellen reduziert (Vacca et al., 2019). Der therapeutische Effekt von 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) wurde zufällig während einer Studie zur Kombinationstherapie von Allopregnanolon und Miglustat entdeckt, bei der es, aufgrund seiner Eigenschaften, als Trägerstoff für Allopregnanolon diente (Davidson et al., 2009). Es zeigte sich, dass neben Miglustat und Allopregnanolon, auch HP β CD einen signifikanten Benefit bewirkte (Davidson et al., 2009; Griffin et al., 2004). Ergebnisse nachfolgender Studien deuten sogar an, dass es insbesondere HP β CD und nicht Allopregnanolon sei, der den aktiven Metaboliten während der Therapie darstellt (Davidson et al., 2009; Liu et al., 2008). Weitere veröffentlichte Studien erhärten diese Annahme und zeigen, dass eine einmalige subcutane Applikation von HP β CD die Lebenszeit von NPC-Mäusen erhöht (Liu et al., 2008). Zu beobachten war ein rapider Konzentrationsanstieg von Cholesterol-Estern, eine Unterdrückung von SREBP2 Zielgenen und letztlich eine verminderte Cholesterin Synthese (Liu et al., 2010). Diese Veränderungen zeigen sich sowohl in der Leber, im Gehirn als auch in peripheren Organen wie der Niere oder der Milz. Die Lunge scheint als einziges Organ unverändert zu bleiben (Liu et al., 2010). Das überschüssige Cholesterol wird schließlich zum metabolisch aktiven Pool umgelagert und über die Gallensäure ausgeschieden. (Liu et al., 2010). Andere Forschungsarbeiten lassen auch beobachten, dass eine HP β CD-Therapie bei NPC-erkrankten Mäusen und Katzen den Prozess der Neurodegeneration verlangsamt und der Tod, im Vergleich zu Kontrolltieren, später eintritt (Davidson et al., 2009; Liu et al., 2008; Vite et al., 2015). HP β CDs physikochemischen Eigenschaften und seine dürftige Pharmakokinetik behindern die notwendige Überwindung der Blut-Hirn-Schranke immens (Kulkarni et al., 2018). Die Therapie sollte daher, neben hochdosierten Infusionen, auch über intrathekale Injektionen, die eine ZNS-Wirksamkeit ermöglichen, erfolgen. Sowohl Infusionen als auch intrathekalen Injektionen müssen, aufgrund des rapiden Abbaus und der zügigen Ausscheidung von HP β CD, mehrmals die Woche erfolgen (Helquist et al., 2013). Während einer offenen Phase-1-2a-Studie (September 2013 - Januar 2015) im National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA) erhielten NPC1-Patienten mit neurologischer Manifestation monatliche intrathekale HP β CD-Injektionen. Auch hier konnte, bei akzeptablem Sicherheitsprofil, eine verlangsamte Krankheitsprogression beobachtet werden. Ergebnisse wie diese unterstützen die Einleitung weiterer kontrollierter, randomisierter und multinationaler Studien zur intrathekalen HP β CD Applikation (Ory et al., 2017). Als signifikante unerwünschte Nebenwirkung von HP β CD ist dessen Ototoxizität zu nennen (Davidson et al., 2016). In diversen NPC Maus- und Katzenmodellen wurde ein zunehmender Hörverlust unter einer HP β CD-Therapie beobachtet. Dieser ist vor allem auf eine Destruktion der äußeren und inneren Haarzellen zurückzuführen (Crumling et al., 2012; Davidson et al., 2016; Ward et al., 2010). Da HP β CD hauptsächlich über den Urin ausgeschieden wird und bei diversen Otoxinen eine Verknüpfung zwischen Innenohr- und Nierenpathologien beschrieben sind, stellt die renale Toxizität eine weitere potentielle Nebenwirkung dar (Crumling et al., 2017). Aus diesem Grund sind, während einer HP β CD-Therapie, sämtliche Nierenparameter engmaschig zu kontrollieren. Der therapeutische Gebrauch von HP β CD wird, trotz

vielversprechender Ergebnisse, durch die intrathekale Applikation, der notwendigen hohen Dosen und der Ototoxizität begrenzt (Kulkarni et al., 2018). Das schlechte pharmakokinetische Profil von HP β CD ließ den Versuch wagen, mittels eines β -Cyclodextrin-basierten Prodrug (ORX-301), therapeutische Einschränkungen zu überwinden (Kulkarni et al., 2018). ORX-301 zeigt im Vergleich zu HP β CD eine verbesserte Bioverteilung und Pharmakokinetik und wirkt bei verringerten Dosen effizienter. Es verlängert bei einer fünffach niedrigeren Dosis die mittlere Lebenszeit der NPC-Mäuse gleichwertig zum herkömmlichen HP β CD (Kulkarni et al., 2018). Des Weiteren ist es ORX-301 möglich, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, sodass die Haupteinschränkungen der gegenwärtig verfügbaren HP β CD Therapie mit der ORX-301-Alternative umgangen werden können. Das β -Cyclodextrin-basierte Prodrug ORX-301 stellt damit ein potentiell Therapeutikum zur Behandlung des NPC dar (Kulkarni et al., 2018). In anderen jüngsten Forschungsarbeiten wurde HP β CD kombiniert mit einem hirnspezifischen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF, vascular endothelial growth factor) verabreicht und ließ einen signifikanten synergistischen Effekt beobachten (Jeong et al., 2019). Kombinations-behandelte (HP β CD und VEGF) Mäuse zeigen im Vergleich zu unbehandelten und HP β CD-monotherapierten NPC-Mäusen eine verbesserte Pathophysiologie. Neben reduzierter abnormaler Lipidakkumulation und verminderter Neuroinflammation konnten die kombinationsbehandelten Mäuse länger ihr Körpergewicht und ihre Motorfunktion beibehalten. VEGFs scheinen die Effekte vom HP β CD zu verstärken und stellen, in Kombination mit HP β CD, eine vielversprechende Therapie des NPC dar (Jeong et al., 2019). Aufgrund der aussichtsreichen präklinischen und klinischen Daten der bereits erwähnten Phase 1-2a-Studie (Ory et al., 2017) wurde das Programm „Therapeutics for Rare and Neglected Diseases—(TRND) von dem Unternehmen „Vtesse Rare Disease Company—lizensiert. Es erhielt von der amerikanischen „Food and Drug Administration—(FDA) die „Breakthrough Therapy Designation—(National Center of Advancing Translational Sciences, National Institutes of Health, 2020). Eine Deklaration für Medikamente, die ernste oder lebensbedrohliche Erkrankungen behandeln und deren klinische Studien signifikante Verbesserungen im Krankheitsverlauf zeigen (U.S. Food and Drug Administration, 2020). Gegenwärtig wird HP β CD in einer multinationalen klinischen Phase-2b-3-Studie getestet, die von „Vtesse Pharmaceuticals—finanziert wird. Ergebnisse sind bisher nicht veröffentlicht (National Center of Advancing Translational Sciences, National Institutes of Health, 2020).

1.2.4 Kombinationstherapie

Die Kombinationstherapie aus Miglustat, HP β CD und Allopregnanolon steht gegenwärtig im Fokus verschiedener Studien und ließ im letzten Jahrzehnt einen positiven Benefit auf den Krankheitsverlauf von NPC1-Mäusen beobachten (Hovakimyan et al., 2013; Maass et al., 2015; Meyer et al., 2017; Neßlauer et al., 2019; Pineda & Perez-Poyato, 2013; Schlegel et al., 2016; Witt et al., 2018). Unter Kombinationstherapie waren verbesserte Motorfunktionen, reduzierte intrazelluläre Fettspeicherungen, ein verminderter Purkinjezellverlust und verlängerte Überlebenszeiten therapierter

NPC1^{-/-} Mäuse nachweisbar (Bräuer et al., 2019). Mithilfe diverser Standardverhaltenstests (Elevated Plus Maze, Accelerod Test, Open-Field und Water-Maze-Test) untersuchte man Bewegungsaktivität, räumliches Denken und Gedächtnisleistungen unbehandelter, placebo-behandelter und kombinationsbehandelter NPC1-Mäuse (Hovakimyan et al., 2013a; Schlegel, 2016; Schlegel, 2017). Während die Kontrolltiere in allen absolvierten Motorik-Tests schwächer abschnitten und der Water-Maze-Test eine Verschlechterung der Gedächtnisleistung beobachten ließ, zeigte sich bei den kombinationsbehandelten Mäusen eine positiv beeinflusste Motorfunktion. Das räumliche Denken und die Gedächtnisfunktion blieben unbeeinflusst (Hovakimyan et al., 2013a). Elektronenmikroskopische Aufnahmen unterstützen die Ergebnisse der Verhaltenstestung und zeigen, dass cerebelläre Purkinje-Zellen unter der Kombinationstherapie reduzierte Akkumulationen aufweisen (Hovakimyan et al., 2013a). Weitere Arbeiten weisen außerdem nach, dass sich sowohl der Fettmetabolismus als auch die Milzmorphologie unter der Kombinationsbehandlung normalisiert (Neßlauer et al., 2019). Darüber hinaus lässt sich im Allgemeinen eine verspätete Manifestation klinischer Symptome und eine signifikante Verlängerung der Lebenserwartung beobachten (Maass et al., 2015). Man nimmt an, dass verschiedene Hirnareale unterschiedlich auf die Behandlung ansprechen, was einerseits die verbesserte Motorfunktion und andererseits die unbeeinflusste Kognition der therapierten NPC1-Mäuse erklären könnte und zugleich Teil dieser Arbeit sein soll (Hovakimyan et al., 2013a). Nebenwirkungen der Kombinationstherapie sind weitestgehend unbekannt. Andere Forschungsarbeiten ließen allerdings bei kombinationstherapierten Wildtyp-Mäusen verringerte Körper- und Hirngewichte beobachten. Auch Miglustat-monotherapierte NPC1^{+/+}-Mäuse zeigten bei unverändertem Körpergewicht ein reduziertes Hirnvolumen (Schlegel et al., 2016). Verantwortlich könnte eine durch Miglustat gehemmte Glucosylceramid-Synthese sein, die eine verminderte Fettspeicherung und Membranbiosynthese bedingt (Treiber et al., 2007).

1.2.5 weitere Therapien

Gegenwärtig werden eine Vielzahl weiterer Behandlungsmethoden des Morbus Niemann Pick Typ C untersucht. Eine Erfolg versprechende Therapie ist die Hemmung der Histone-Deacetylasen (HDACs). Diese Enzyme regulieren den Zellzyklus und die Transkription genetischer Informationen (Gregorette et al., 2004). Studien zeigen, dass HDAC-Inhibitoren (HDACi) die Cholesterolaufnahme und -abgabe durch Modifikationen von Schlüsselgenen der Cholesterolsynthese beeinflussen und erhöhte Cholesterolspiegel in neuronalen Zellen senken (Bardai et al., 2012; Nunes et al., 2013). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass bereits zugelassene HDACis zu einer reduzierten Cholesterolakкумуляtion in Lysosomen und Endosomen führen. Zu beobachten war außerdem ein erhöhter NPC1-Protein-Spiegel, wodurch sich HDACis insbesondere zur Therapie von NPC-Patienten, die noch eine Restaktivität des NPC1-Proteins aufweisen, eignen (Helquist et al., 2013; Pipalia et al., 2011; Vance & Karten, 2014). Da herkömmliche HDACis nicht in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, haben sie einen begrenzten Wert in der Behandlung

neurologischer Erkrankungen. Dieser Umstand war Anreiz für die Entwicklung des Präparats „Vorinostat“ (Handelsname in den USA: Zolinza). Ein neuartiger, ZNS-gängiger HDAC-Inhibitor, der bei NPC-Mäusen eine verbesserte Hirnfunktion und verlängertes Überleben beobachten lässt und damit für eine Behandlung des Morbus Niemann Pick Typ C oder anderen neurologischen Erkrankungen in Frage kommt (Alam et al., 2016). Als weiteres Therapie-Target ist die Wiederherstellung eines physiologischen Calcium-Haushalts zu nennen. Wie bereits erwähnt, stellen Sphingosin-Ablagerungen einen initiierenden Faktor der NPC1-Pathogenese dar und bedingen eine gestörte Calcium-Homöostase. Diese wiederum zieht weitere, sekundäre Sphingosin- und Cholesterol-Akkumulationen nach sich. Studien zeigen, dass Curcumin den zytosolischen Calciumspiegel erhöht, die Homöostase wiederherstellt und das Überleben der damit behandelten NPC1-Mäuse, im Vergleich zu Kontrolltieren, verlängert (Lloyd-Evans et al., 2008). Jüngste Arbeiten evaluieren auch den Effekt einer Gen-Therapie am NPC-Mausmodell. Für diese wurde ein AAV9-Vektor (adeno-associated-virus-serotype 9), der das NPC1-Gen transportiert, verwendet. Beobachtet wurden ein verspätetes Einsetzen der Gewichtsabnahme, mildere Motorikeinbußen und verlängerte Überlebenszeiten. Ebenso erwiesen sich die Cholesterolakkumulation und der Purkinjenzellverlust als regredient (Chandler et al., 2017). Zusätzlich wurde die AAV9-vermittelte Gentherapie mit einer Miglustat-Therapie verglichen. Auch bei niedrigen Dosen zeigt die AAV9-Behandlung einen positiven krankheitsmodifizierenden Effekt, mit dem Vorteil, dass die bekannten Nebenwirkungen einer Miglustat Therapie ausbleiben (Hughes et al., 2018). Weitere Forschungsarbeiten zur NPC-Therapie zeigen, dass sowohl NPC1-Fibroblasten als auch Hirngewebe und neuronale Stammzellen von NPC1-Patienten erhöhte RIP1- und RIP3-Kinase Expressionen (RIP = rezeptor-interacting-protein) aufweisen. Bei diesen Kinasen handelt es sich um enzymatisch aktive Schlüsselkomponenten der Nekroptose, die wesentlich am Prozess des neuronalen Zellverlustes beteiligt sind (Cougnoux et al., 2016; Degterev et al., 2008). Dazugehörige Studiendaten suggerieren einen positiven Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Kinase-Expression und der Schwere der Erkrankung. Die medikamentöse Inhibition der RIP1-Kinase mittels des allosterischen Hemmers, Necrostatin-1, reduziert sowohl in vitro als auch in vivo den Zelltod und führte zu einem verspäteten Progress der neurologischen Symptome (Cougnoux et al., 2016). Darüber hinaus zeigen sich bei den behandelten NPC-Mäusen, im Vergleich zu den Kontrolltieren, ein verzögerter Purkinjenzellverlust und ein verlängertes Überleben. Damit stellen auch die RIP-Kinase-Hemmer eine weitere Therapiealternative des NPC dar (Cougnoux et al., 2016). Andere naheliegende Therapiestrategien mittels lipidsenkender Medikamente, cholesterinärmer Diätpläne, Stammzell- oder Lebertransplantationen erwiesen sich hinsichtlich einer Verbesserung der neuronalen Funktion als wirkungslos (Vanier, 2010).

1.3 Tiermodell und bisherige Erkenntnisse zur Neuropathologie

In der heutigen Zeit werden Tiermodelle häufig genutzt, um die molekulare Pathogenese menschlicher Erkrankungen zu erforschen, Therapiestrategien entwickeln zu können und deren Nebenwirkungen aufzuzeigen (BMBF, 2020). In der präklinischen Forschung wird die Maus besonders gerne eingesetzt. Als Versuchstier besitzt sie diverse Vorteile wie beispielsweise eine kostengünstige und einfache Haltung bei gleichzeitig geringer genetischer Variabilität in den Versuchsgruppen, die auf eine Vielzahl an Inzuchtstämmen zurückzuführen ist (GIT Laborportal, 2020). Aufgrund der niedrigen Inzidenz und Prävalenz des Morbus Niemann-Pick, sind humane Gewebeproben äußerst selten und damit auch die Untersuchungsmöglichkeiten stark beschränkt. Um dennoch pathologische Veränderungen des NPC und eventuelle Effekte durchgeführter Therapien darstellen zu können, wurde in dieser Arbeit das Mausmodell BALB/c verwendet. Es zeigt viele Parallelen zum klinischen Verlauf der frühen infantilen Form des humanen Morbus Niemann-Pick Typ C und wird sehr häufig für NPC-Studien verwendet (Maue et al., 2012). Das Mausmodell BALB/c besitzt das Niemann-Pick Typ C1 NIH Allel, dessen Phänotyp sich nur bei Homozygotie vollständig ausprägt (Pentchev et al., 1980). Durch eine Spontanmutation mit Insertion einer Retroposon-ähnlichen Sequenz im NPC1-Gen und resultierender Frameshiftmutation mit einem Stop-Codon, kommt es zum Abbruch der Kodierung und einem Funktionsverlust des NPC1-Proteins (Carstea et al., 1997). Im Tiermodell zeigt sich eine reduzierte Sphingomyelinase- und Glucocerebrosidase-Aktivität, der, entsprechend des Phänotyps von NPC-Erkrankten, eine Akkumulation von Glucocerebrosiden und Sphingomyelin folgt. Darüber hinaus können beim BALB/c Mausmodell auch, die für den NPC typischen, Cholesterollagerungen und ein massiv progressiver Purkinjezellverlust beobachtet werden (Li et al., 2005; Morris, 1982; Pentchev et al., 1980). Im NPC-Mausmodell zeigt sich die typische intrazelluläre Gangliosidspeicherung hauptsächlich in den großen Pyramidenzellen, in den Purkinjezellen des Cerebellum, in Neuronen des lateralen Thalamus, im Hippocampus und im Hirnstamm (German et al., 2001; Zervas et al., 2001). In den ersten zwei Lebenswochen kann, abgesehen von axonalen Abnormalitäten im Corpus Callosum, keine neuronale Degeneration beobachtet werden (German et al., 2001; Ong et al., 2001; Yamada et al., 2001). Ab der vierten Lebenswoche zeigen Thalamus, Striatum, Cerebellum und Substantia nigra axonale Degenerationen. Einige NPC1-Mäuse werden zwischen der fünften und siebten Lebenswoche ataktisch und verlieren ihr Körpergewicht (German et al., 2001; Ong et al., 2001). Ab der zehnten Woche weisen auch der Globus Pallidus, der ventrale laterale Thalamus, das mediale Corpus geniculatum und die tiefen Kleinhirnerneuronen neuronale Degenerationen auf. Ab der zehnten Woche ist das gesamte Gehirn betroffen und nahezu alle Purkinje Zellen degeneriert (Baudry et al., 2003). Der größte Purkinjezellverlust kann im Cerebellum beobachtet werden. Hier zeigen sich in der elften Lebenswoche eine 96%-ige Zellzahlverminderung (German et al., 2001). Eine andere quantitative Studie weist sogar einen Verlust von fast 100% in der zehnten Lebenswoche nach (Tanaka et al., 1988). Darüber hinaus kann eine signifikante Volumenreduktion der Kleinhirnhemisphären von 29% beobachtet werden (German et al., 2001). Im

Hirnstamm zeigt sich der Verlust dopaminerger Neurone und eine Astrogliose in der Substantia nigra (Luan et al., 2008). Auch die Länge der Medulla oblongata nimmt bei erkrankten Mäusen im Vergleich zu Ihren Kontrolltieren ab (Luan et al., 2008). Der zerebrale Kortex hingegen zeigt nur leichte bis moderate Degenerationserscheinungen. Lediglich der präfrontale Kortex lässt eine signifikante Neuronenreduktion von 28% und eine Volumenreduktion von 19% beobachten (German et al., 2001a; German et al., 2001b). Im Tiermodell weisen die erkrankten Mäuse degenerativ veränderte Myelinscheiden auf (Lope-Piedrafita et al., 2008) und unterstützen damit die Idee, dass NPC1-Defekte eine abnormale Myelinbildung bedingen und sekundär zur Demyelinisierung führen (German et al., 2002). Die BALB/c-Mäuse entwickeln zwischen dem 30. und 35. Lebenstag einen Tremor der Hinterbeine, dem, 4 bis 6 Wochen nach dem Abstillen, zuckende Bewegungen und ein schwankender Gang folgen. Das Gewicht der erkrankten Zuchttiere liegt stets unter dem der nicht betroffenen Wurfgeschwister. Das vorzeitige Ableben tritt in der Regel zwischen dem 80. und 120. Lebenstag ein (Morris, 1982). Während BALB/c in seinem Verlauf eher der schweren infantilen Form des Morbus Niemann Pick Typ C ähnelt, gleicht der Phänotyp eines anderen etablierten Mausmodells, C57BL/6J NPC1^{nmf164}, der späten Form des NPC. Bei diesem Modell bedingt eine Punktmutation den Austausch der Aminosäure Aspartat durch Glycin (Asp1005Gly) im NPC1-Gen. Sie entspricht der Stelle, auf der ungefähr ein Drittel der identifizierten humanen Mutationen lokalisiert sind und befindet sich im großen, cysteinreichen loop des NPC1-Proteins (Maue et al., 2012; Park et al., 2003). Der spät einsetzenden Form entsprechend, zeigen die C57BL/6J NPC1^{nmf164} Mäuse ein NPC ähnliches Lipidprofil mit gleichzeitig weniger drastischem Purkinjezellverlust und reduzierter Gewichtsabnahme. Da die spät einsetzende Form des humanen NPC deutlich häufiger als die frühe infantile Form auftritt, ist auch dieses Mausmodell von besonderer Bedeutung für die Forschung (Maue et al., 2012). Andere in der Literatur beschriebene Tiermodelle sind das C57BL/KsJ-NPC1^{spm}-Mausmodell, mit einer nicht näher bekannten und zu NPC1 führenden Spontanmutation (Miyawaki et al. 1982; Sakiyama et al. 1982) und das relativ häufig verwendete Katzenmodell (Somers et al., 2003; Vite et al., 2015). Aufgrund der häufig beobachteten kognitiven Einbußen NPC1-erkrankter Patienten und -Tiere, befasst sich diese Arbeit mit den mutationsbedingten Veränderungen der Subregionen des Hippocampus, der Area entorhinalis und des piriformen Kortex. Im Folgenden soll ein Überblick zur Anatomie, Zytoarchitektur und Geschichte gegeben werden.

1.4 Geschichte des Hippocampus

Der Hippocampus wurde zum ersten Mal von Julius Caesar Arantius im Jahre 1587 in seinem Werk „De Humano Foetu Liber—beschrieben (Bir et al., 2015). Er verglich die Vorwölbung am Boden des Seitenventrikels mit einem Seepferdchen und verlieh ihr letztlich den Namen Hippocampus, eine Bezeichnung, die sich aus den griechischen Wörtern „hippos— für Pferd und „kampos— für „Seemonster— zusammensetzt. Andere Gelehrte wie J.G. Duvernoy schlugen im Jahre 1729 stattdessen „weiße Seidenraupe—(Lewis, 1923) oder Winslow (1732) „Widderhorn" (Duvernoy,

2005) vor. Während die erste Periode der Begriffsfindung hauptsächlich auf dem intraventrikulären Erscheinungsbild des Hippocampus basierte, war die zweite Periode durch eine übermäßige Metaphorik der Anatomen charakterisiert. Der Hippocampus wurde nun mit Symbolen der Mythologie verglichen. Das Widderhorn wurde beispielsweise von De Garenget (1742) zum „Cornu Ammonis—umbenannt, dem Ägyptischen Gott Ammon (Lewis, 1923). Eine Begrifflichkeit, die auch heute noch in Gebrauch ist. Auch die Bezeichnung „Pes Hippocampi—(Pes: lateinisch für Fuß) stammt aus dieser Zeit und ist wahrscheinlich auf Ähnlichkeiten zwischen dem mythischen Tier, das Poseidons Streitwagen über das Meer zog, und einem Seepferdchen zurückzuführen. Während der vordere Part des Tieres einem zweifüßigen Pferd glich, war der hintere Teil wie ein Fisch geformt. In dieser Darstellung wurden die Füße des mythischen Tieres mit den, dem Hippocampus direkt anliegenden, Seitenventrikeln verglichen (Duvernoy, 2005). Heutzutage werden die Bezeichnungen „Cornu Ammonis—und „Pes Hippocampi—oft als Synonyme genutzt (Kopsch & Rauber, 1922). Obwohl letzteres auch manchmal für das anteriore verbreiterte Ende des Hippocampus verwendet wird (Williams, 1995). Die gegenwärtige und geläufigste Terminologie des „Hippocampus—beschreibt die gesamte Vorwölbung am Boden des Seitenventrikelunterhorns (Duvernoy, 2005).

1.5 Anatomie des Hippocampus

Der Hippocampus besteht aus dem Ammonshorn und dem Gyrus dentatus, die als gemeinsame Struktur an der Medialwand des Seitenventrikelunterhorns im Temporallappen liegen (Trepel, 2017). Gemeinsam mit dem medial davon liegenden Gyrus parahippocampalis, der die Area entorhinalis

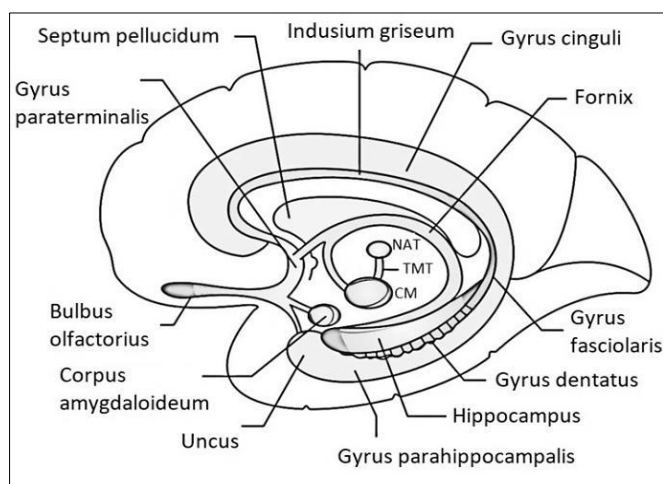


Abbildung 6: Anatomie des Hippocampus

CM – Corpora mamillare, TMT – Tractus mamillothalamicus, NAT – Nucleus anterior des Thalamus, modifiziert nach Earthlab 2020, Quelle: <https://www.earthslab.com/anatomy/limbic-system/>

Teil des Hypothalamus (Swaab, 2003; Trepel, 2017). Der Hippocampus setzt sich als Indusium griseum, einem dünnen Streifen grauer Substanz kranial des Corpus callosum, fort (Abbildung 6) (Trepel, 2017).

und das Subiculum beinhaltet, bilden sie die Hippocampusformation, die einen wichtigen Bestandteil des limbischen Systems darstellt (Schünke et al., 2015; Trepel, 2017). Das rostrale Endstück des Hippocampus wird vom tatzenähnlich aufgeweiteten Pes Hippocampi gebildet. Dieser zieht aufgrund der embryonalen Hemisphärenrotation bogenförmig zum kaudalen Ende des Corpus Callosum und setzt sich in die Faserstruktur des Fornix fort (Trepel, 2017). Der Fornix zieht zwischen dem III. Ventrikel und dem Corpus Callosum nach rostral und endet in den Corpora mamillaria, dem kaudalen

1.6 Zytoarchitektur und Verbindungen des Hippocampus

Der Hippocampus ist gegenüber dem Isocortex eine phylogenetisch ältere Struktur. Er liegt entwicklungsgeschichtlich bedingt als dreischichtiger Allocortex vor und wird dem sechsschichtigen Isocortex häufig gegenübergestellt (Schünke et al., 2015; Trepel, 2017). Der eigentliche Hippocampus,

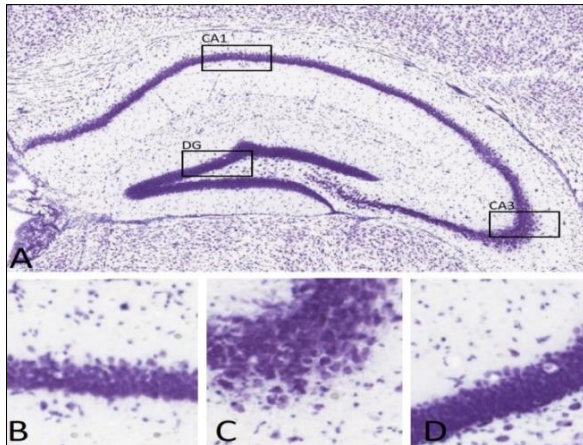


Abbildung 7: Zytoarchitektur Hippocampus

A: Zytoarchitektur Hippocampus im Überblick, B: dicht gepackte Pyramidenzellen in CA1, C: locker gepackte Pyramidenzellen in CA3, D: kleine Körnerzellen im Gyrus Dentatus, modifiziert nach Allen Mouse Atlas 2020

Quelle: <https://atlas.brain-map.org>

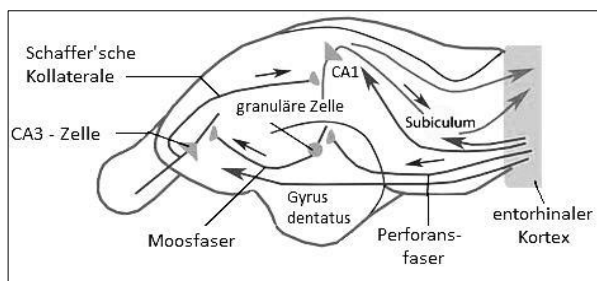


Abbildung 8: Erregender Neuronenkreis im Hippocampus

Quelle: http://physiologie.cc/Hippocamp_F.jpg (modifiziert)

entorhinalis auf die Körnerzellen im Gyrus dentatus projizieren (Schünke et al., 2015; Trepel, 2017; Zilles, 2010). Die Area entorhinalis wiederum erhält ihre Afferenzen aus unzähligen Hirnregionen und stellt damit das Tor zum Hippocampus dar (Schünke et al., 2015). Die Körnerzellen im Gyrus Dentatus projizieren mit ihren Axonen, den Moosfasern, auf die Pyramidenzellen der Region CA3 (Trepel, 2017). Die Pyramidenzellen des Cornu Ammonis (CA1-CA3) projizieren als efferentes System des Hippocampus über den Alveus und die Fimbria hippocampi in den Fornix zu septalen Kernen oder den Corpora mammillaria und bilden so einen Teil des Papez-Neuronenkreises (Schünke et al., 2015; Trepel, 2017). Der Papez-Neuronenkreis, benannt nach seinem Erstbeschreiber Papez (1937), verknüpft Kerngebiete des limbischen Systems wie Hippocampus, Corpora mammillare,

das Cornu Ammonis, lässt sich in drei Hauptschichten unterteilen: in das Stratum oriens mit basalen Dendriten der Pyramidenzellen und Interneuronen, in das Stratum pyramidale, bestehend aus Pyramidenzellkörpern und letztlich das Stratum radiatum-lacunosum-moleculare mit apikalen Dendriten der Pyramidenzellen und afferenten Fasern (Zilles, 2010). Anhand der unterschiedlichen Größe und Dichte der Pyramidenzellen im Stratum pyramidale, lässt sich das Cornu Ammonis in die Regionen CA 1 – 3 unterteilen. In der vorliegenden Arbeit wurden CA2 und CA3, aus übersichtlichen Gründen und keinen wesentlichen funktionellen Unterschieden, zu einem Areal zusammengefasst (Schünke et al., 2015; Trepel, 2017). Im Gyrus dentatus, auch Fascia dentata genannt, liegen hingegen hauptsächlich kleinere körnerzellartige Neurone (**Abbildung 7**) vor und bilden das Stratum granulosum (Schünke et al., 2015; Zilles, 2010). Die wichtigste afferente Bahn des Hippocampus wird durch den Tractus perforans (Perforansfasern) gebildet (**Abbildung8**), in dem Pyramidenzellen der Area

Thalamus und Gyrus cinguli miteinander (Schünke et al., 2015). Er trägt damit entscheidend zur Inhaltsüberführung vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis bei (Trepel, 2017). Pyramidenzellen aus CA3 stehen über sogenannte Schaffer-Kollaterale mit CA1 in Verbindung (**Abbildung 8**), das letztlich zurück zum Subiculum und dem entorhinalen Kortex projiziert. Die beschriebenen zirkulierenden Impulse sind essenziell für die Gedächtnisbildung und Lernprozesse bei Mensch und Tier (Trepel, 2017).

1.7 Das limbische System und die Funktionsweise definierter kortikaler Strukturen

Obwohl die spezifischen Funktionen des limbischen Systems, der Area entorhinalis oder des piriformen Kortex im Fokus diverser Forschungsarbeiten stehen, sind sie noch immer zu großen Teilen unverstanden. Einen Überblick zu ihrer vermuteten Funktionsweise und ihren Aufgaben im zentralen Nervensystem, soll der folgende Abschnitt geben.

1.7.1 Cornu Ammonis Region 1

Die CA1-Region erhält ihre Afferenzen hauptsächlich über Schaffer'sche-Kollaterale von CA3 und über reziproke Projektionen vom Subiculum. Man nimmt an, dass CA1 entscheidend für das Wiedererleben detaillierter episodischer Erinnerungen und dem Abruf des autobiographischen Gedächtnisses ist (Bartsch et al. 2011). Des Weiteren wird vermutet, dass die CA1-Region eine wesentliche Rolle bei der räumlichen Orientierung und der Fähigkeit, die Umgebung als kartenähnliche Darstellung zu lernen, spielt (Suthana et al., 2009). Das räumliche Denken scheint wesentlich von sogenannten „place-Zellen in CA1 abhängig zu sein (Lee, Yoganarasimha et al., 2004).

1.7.2 Cornu Ammonis Region 3

CA3 scheint eine wichtige Rolle beim Codieren von neuen räumlichen Informationen zu besitzen (Stupien et al., 2003). Die Verarbeitung erfolgt innerhalb des Kurzzeitgedächtnis mit einer Dauer von Sekunden bis Minuten (Kesner, 2007). Eine der Haupteigenschaften von CA3 ist sein autoassoziatives Netzwerk. Hier sind CA3-Neurone untereinander und über rückläufige Kollateralverbindungen verbunden. Die Neurone von CA3 stellen dabei verschiedene Komponenten einer Erinnerung dar (Gilbert et al., 2009; Ishizuka et al., 1990). CA3 erhält seine Afferenzen hauptsächlich vom Gyrus dentatus und sendet gleichermaßen reziproke Projektionen. Forschungsarbeiten dazu zeigen, dass CA3 die Neurogenese des Gyrus dentatus regulieren kann (Liu et al., 2011).

1.7.3 Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus erhält als erste Instanz der Hippocampusformation Afferenzen des entorhinalen Kortex und trägt damit wesentlich zur Informationsverarbeitung und der Bildung des episodischen Gedächtnisses bei. Darüber hinaus ist er, nach aktuellem Stand der Wissenschaft, der einzige Ort, an dem auch im adulten Gehirn eine Neurogenese stattfindet (Anacker et al., 2017; Pineda et al., 2019; Sahay et al., 2007). Im Bereich zwischen dem Stratum granulare und dem Hilus des Gyrus Dentatus

liegen neuronale Stammzellen, die durch mitotische Teilung neuronale Vorläuferzellen bilden können (Anacker et al., 2017; Bischofberger et al., 2006). Des Weiteren sollen pathologische Veränderungen im Bereich seines Körnerzellbandes an der Entstehung einer Temporallappenepilepsie beteiligt sein. Ein Zusammenhang, der die Bedeutung eines intakten Gyrus dentatus verdeutlicht (Marucci et al. 2010; Pallud et al., 2011).

1.7.4 Subiculum, Prä – und Parasubiculum

Das Subiculum verbindet den Hippocampus mit dem Gyrus parahippocampalis und erhält seine Afferenzen von CA1-Neuronen. Efferenzen bestehen zum Cortex prefrontalis, der Amygdala und dem Hypothalamus (Amaral et al., 2007; Duvernoy, 2005). Das Prä- und das Parasubiculum bilden die Übergangszone vom Hippocampus zum entorhinalen Cortex. Die Funktion des Subiculus innerhalb der Hippocampusformation ist noch weitestgehend unerforscht. Studien zu diesem Hirnareal untersuchen seine neurophysiologischen und anatomischen Gegebenheiten und lassen vermuten, dass es der Amplifizierung des hippocampalen Outputs dient (O'Mara, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass es eine funktionelle Trennung zwischen dem ventralen und dorsalen Teil des Subiculus zu geben scheint. Während der ventrale Part eine regulierende Rolle bei der Hemmung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und der Aktivierung des dopaminergen Systems zu haben scheint, ist der dorsale Teil für die Informationsverarbeitung von räumlichen Einflüssen zuständig (Cooper et al., 2006; Mueller et al., 2004; O'Mara, 2006). Die Funktion des Prä- und Parasubiculus (PS) konnte bisher nicht vollständig geklärt werden und wird häufig dem dorsalen Part des Subiculus gleichgesetzt. Beide Areale scheinen ebenfalls an der Verarbeitung räumlicher Eindrücke beteiligt zu sein. Forschungsarbeiten zum PS beschreiben das Vorhandensein sogenannter „grid—und „place-cells—, die in Abhängigkeit ihrer Aktivität in unterschiedlichen Gittermustern feuern und so der Orientierung im Raum dienen (Boccaro et al., 2010; Tang et al., 2016; Taube, 1995).

1.7.5 Piriformer Kortex

Der piriforme Kortex (PIRI) umschreibt, als Part des Rhinencephalons, das Rindenareal des Lobus piriformis. Er besteht aus drei Schichten und gehört zum olfaktorischen System. Während die oberflächliche Schicht aus Axonen der Mitral- und Büschelzellen des Bulbus olfactorius (BO) und des ipsilateralen Nucleus olfactorius anterior (NOA) besteht, wird die mittlere Schicht von Zellkörpern der Pyramiden- und multipolaren Zellen gebildet. Die darunterliegende dritte Schicht besteht aus zahlreichen Assoziationsfasen anderer Hirnregionen und Pyramidenzellen (Vaughan & Jackson, 2014). Der PIRI erhält seine Afferenzen über den BO und den NOA und sendet im Gegenzug Efferenzen zur Area entorhinalis, dem Kortex orbitofrontalis, der Amygdala und dem Hypothalamus (Carmichael et al., 1994; Howard et al., 2009). Er besitzt eine wichtige Rolle bei der Diskriminierung von Gerüchen (Howard et al., 2009), der Bildung eines olfaktorischen Arbeitsgedächtnisses (Zelano et al., 2009) und der Weiterleitung von Informationen in andere Hirnareale (Nigri et al., 2013). Die Aktivität des PIRIs kann bei allen olfaktorischen Aufgaben nachgewiesen werden (Gottfried, 2010).

Während des Prozesses einer Geruchsidentifizierung, können auch Aktivitäten im entorhinalen Kortex und Hippocampus beobachtet werden. Es wird angenommen, dass die limbische Verarbeitung olfaktorischer Stimuli zum Teil Emotionen und soziales Verhalten beeinflussen kann (Kjelvik et al., 2012). Der PIRI kann, basierend auf der Dicke seiner dritten Zellschicht und dem aufliegenden Tractus olfactorius lateralis, in einen anterioren und einen posterioren Abschnitt unterteilt werden (Löscher et al., 1996). Während der anteriore Part für die Codierung der molekularen Zusammensetzung eines Geruchs zuständig ist, wird die Qualität der Eindrücke vom posterioren Part bewertet (Royet et al., 2011). Der piriforme Kortex wird aufgrund seines hohen epileptogenen Potentials und dem häufigen Auftreten von olfaktorischen Auren, während einer Temporallappenepilepsie, mit der Entstehung von fokalen Epilepsien assoziiert. Eine Schädigung des PIR kann darüber hinaus, je nach Ausprägung, mit olfaktorischen Defiziten einhergehen (Li et al., 2010; Vaughan et al., 2014; Wilson et al., 2015).

1.7.6 Area entorhinalis

Das Rindenfeld der Area entorhinalis (AE) liegt am medialen Rand der Großhirnloben im Gyrus parahippocampalis und entspricht der Brodmann Area 28 (Area entorhinalis) und 34 (Area entorhinalis dorsalis) (Van Hoesen & Pandya, 1975). Die AE verbindet den Neokortex mit dem Hippocampus und sendet zahlreiche Afferenzen über Perforanzfasern zum Gyrus dentatus, dem Subiculum und allen weiteren Subfeldern des Hippocampus (Kerr et al., 2007; Van Cauter et al., 2013). Die AE lässt sich anatomisch in zwei Subregionen unterteilen. Den medialen entorhinalen Kortex (MEK) und den lateralen entorhinalen Kortex (LEK). Obwohl beide den gleichen intrinsischen Aufbau besitzen, scheinen sie unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften und kortikale Verbindungen zu haben (Van Cauter et al., 2013). Sowohl der MEK als auch der LEK verarbeiten räumliche und nicht räumliche Informationen. Dies scheint allerdings unabhängig voneinander zu passieren (Hargreaves et al., 2005). Weitere Forschungsarbeiten zur AE zeigen, dass der dorsokaudale MEK (dMEK) eine topografisch organisierte neuronale Karte der räumlichen Umgebung besitzt. Die Schlüsseleinheit stellt dabei die „Grid-Zelle“ dar. Sie wird aktiviert, sobald sich Lebewesen im Raum fortbewegen oder orientieren (Hafting et al., 2005). Ebenfalls konnte beobachtet werden, dass sogenannte „Speed-Zellen“ im MEK propriozeptive Informationen erhalten und die Geschwindigkeit von Bewegungen, mittels ihrer Aktivität und Feuerraten, repräsentieren (Kropff et al., 2015). Darüber hinaus wird der beim Morbus Alzheimer zu beobachtende Zelluntergang der Area entorhinalis mit auftretenden Gedächtnisstörungen assoziiert. Was wiederum die essenzielle Rolle des entorhinalen Kortex für ein funktionierendes Gedächtnis verdeutlicht (Price et al., 2001).

1.8 Bedeutung des Hippocampus und Neuropathologische Veränderungen im limbischen System bei NPC1

Basierend auf unzähligen in der Literatur gefundenen Forschungsarbeiten, werden dem Hippocampus, neben seiner herausragenden Rolle bei der Gedächtnisbildung, auch eine mögliche Beeinflussung des

emotionalen Verhaltens, die Regulierung hypothalamischer Funktionen und einige Aspekte der motorischen Kontrolle zugesagt (Amaral et al., 2007; Jacobson & Sapolsky, 1991; Trepel, 2017). Aus diesem Netz wichtiger Aufgaben heraus, lässt sich schlussfolgern, dass ein unversehrter Hippocampus essenziell für die Bewältigung alltäglicher Aufgaben, dem Neuerlernen von Fähigkeiten und der aktiven Teilhabe am Gesellschaftsleben ist. Aufgrund seiner herausragenden Stellung im zentralen Nervensystem, ist er damals wie heute Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten. Zahlreiche neurodegenerative Krankheiten können zu Veränderungen des limbischen Systems führen. Allen voran steht die Demenz- und im engeren Sinne die Alzheimer-Erkrankung. Sie gehen in aller Regel mit einer Atrophie des Hippocampus einher und werden teilweise auf Rezeptorveränderungen und Neuronenuntergänge zurückgeführt (Halliday, 2017; Kinnunen et al., 2018; Mann et al., 1985; Sze et al., 1997; Trepel, 2017). Studien zeigten auch, dass schwere depressive Erkrankungen ein signifikant reduziertes Hippocampusvolumen mit bis zu 35% verminderten Pyramiden- und Gliazellen in sämtlichen Arealen des Hippocampus hervorrufen können (Eriksson, 2012; Stockmeier et al., 2004; Videbech & Ravnkilde, 2004). Auch die Entstehung einer Schizophrenie wird mit einer drastischen Abnahme glutamaterger Neurone im Cornu Ammonis assoziiert (Falkai & Bogerts, 1986; Heckers & Konradi, 2002; Trepel, 2017). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Temporallappenepilepsie häufig auf eine Sklerose des Hippocampus zurückzuführen ist und gleichzeitig mit einem großen Nervenzellverlust einhergeht (Raymond et al., 1994; Riban et al., 2002; Thom, 2014). Ein beidseitiger Hippocampusschaden, durch Durchblutungsstörungen oder eine Herpesvirus-induzierte-Enzephalitis, kann zeitliche und örtliche Desorientierung zur Folge haben (Trepel, 2017; Yoshikawa, 2010). Während altbekannte Dinge im Gedächtnis gespeichert bleiben, können neue Inhalte nicht länger als ein paar Minuten behalten werden, da die Überführung vom Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis gestört ist (Trepel, 2017). Läsionen des limbischen Systems können sich demnach äußerst variabel präsentieren. Die resultierende pathologische Klinik verdeutlicht die essenzielle Rolle des limbischen Systems und des Hippocampus im engeren Sinne für den Menschen. Physiologischerweise besteht der Hippocampus mit Ammonshorn, Gyrus dentatus und Subiculum aus einem Geflecht vernetzter Pyramiden – und Körnerzellen, die über Faserverbindungen untereinander und mit diversen Hirnarealen in Kontakt stehen. Neuropathologische Veränderungen, des limbischen Systems, der Area entorhinalis oder des piriformen Kortex beim NPC1 sind weitestgehend unerforscht. In der Literatur sind einige wenige NPC1-Studien zu finden, die auch das limbische System und im speziellen den Hippocampus untersuchen und entsprechende Ergebnisse veröffentlicht haben. Beispielsweise beschäftigte sich die Gruppe um Walterfang et al. (2013) mit der Volumenabnahme diverser subkortikaler Hirnstrukturen NPC-erkrankter Patienten. Das absolute Volumen wurde anhand T1-gewichteten MR-Schnittbildern und dem „FMRIB Integrated Registration and Segmentation Tool–(FIRST) bestimmt und mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Sowohl der Hippocampus, Thalamus als auch das Striatum der NPC-Patienten zeigen im Vergleich zu ihren geschlechtsgleichen Kontrollpatienten signifikante Volumenreduktionen. Darüber hinaus kann

beobachtet werden, dass das Volumen der linken Hippocampusseite mit dem NPC-Symptomscore (Illness-Scale-Score) und der Kognition der NPC-Patienten korreliert. Während der Hippocampus eine Schlüsselrolle beim deklarativen und episodischen Gedächtnis spielt, ist der Thalamus essentiell für die Informationsverarbeitung. Beide sind über diverse Leitungsbahnen wie die Fornix und der Tractus mamillothalamicus miteinander verbunden. Man vermutet, dass ihr neuronaler Zell- und Volumenverlust Ursache für die neuropsychologischen Beeinträchtigungen des NPC sein könnten, was unter anderem auch in dieser Arbeit untersucht werden soll (Walterfang et al., 2013). Ergebnisse von Vertex Analysen der Studie zeigen auch eine signifikante Volumenabnahme der CA1-Region und des Subiculus (Walterfang et al., 2013). Eine andere Forschungsarbeit der Gruppe um Ong et al. (2001) zeigt am BALB/c-Mausmodell, dass die Subregion CA1 zwischen dem 22. – und 30. postnatalem Tag eine dichte Degeneration terminaler Pyramidenzellen im stratum oriens,- radiatum und – lacunosum aufwies. Während die Zellkörper der Pyramiden- und Körnerzellen weitestgehend intakt bleiben, lässt sich in der Molekularzellschicht des Gyrus dentatus ebenfalls ein schmales Band degenerierter Terminalen beobachten. Im Stratum radiatum von CA2 kann nur ein sehr schmales Band zurückgebildeter Terminalen nachgewiesen werden. CA3 zeigt hingegen keine morphologischen Veränderungen. Der Nucleus basalis und das Septum weisen stark verkümmerte Pyramidenzellterminalen auf. Die Zellkörper fehlen fast vollständig (Ong et al., 2001). Andere Neuropathologische Studien an NPC1-erkrankten Patienten zeigen auch, dass es in Basalganglien, Hirnstamm, Thalamus und Hippocampus zur Bildung neurofibrillärer Bündel kommt. Diese sind auch bei der Alzheimer-Demenz zu finden (Love et al., 1995; Suzuki, 1997).

1.9 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die morphologischen Auswirkungen des Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) auf das limbische System und das Körper- und Hirngewicht darzustellen. Die Untersuchungen wurden anhand des BALB/c Mausmodells durchgeführt und im Vergleich zur Morphologie gesunder Kontrolltiere betrachtet. Zu den subkortikalen Strukturen von Interesse gehören CA1, CA3, der Gyrus Dentatus, das Subiculum, Prä- und Parasubiculum, der piriforme Kortex und die Area entorhinalis. Es wurden sowohl gesunde als auch erkrankte Versuchstiere mit einer Monotherapie aus Miglustat (Miglu), einer Monotherapie aus 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (Cyclo) oder einer Kombinationstherapie (Kombi) aus Miglustat, Allopregnanolon und HP β CD behandelt. Überprüft werden soll nun, ob die vorher definierten Areale subkortikaler Strukturen Volumenveränderungen aufweisen. Die stereologische Auswertung erfolgte anhand histologischer Schnittreihen der Mäusehirne:

- 1) Gibt es eine Auswirkung von NPC1 auf das Körper- und Hirngewicht der erkrankten Versuchstiere im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren?
- 2) Inwieweit beeinflussen die unterschiedlichen Therapieregime das Körper- und Hirngewicht der erkrankten und gesunden Versuchstiere?
- 3) Beeinflusst das defiziente NPC1-Gen das Volumen limbischer Hirnstrukturen?

- 4) Wie wirken sich Kombinationstherapie und beide Monotherapien auf das Volumen definierter Areale des limbischen Systems erkrankter Mäuse aus?
- 5) Wie wirken sich Kombinationstherapie und beide Monotherapien auf das Volumen definierter Areale des limbischen Systems gesunder Mäuse aus?
- 6) Wirken die Therapieregime unterschiedlich innerhalb der behandelten Versuchsgruppen?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Mäuse des Stammes BALB/c Nctr-Npc1^{m1N}/J wurden über das Jackson Laboratory (600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609, USA) bezogen und im Institut für Anatomie der Universität Rostock gezüchtet. Die Paarung heterozygoter Tiere (NPC1^{+/-}) ergab homozygote Kontrolltypen (NPC1^{+/+}), homozygote erkrankte Tiere (NPC1^{-/-}) sowie heterozygote Tiere (NPC1^{+/-}). Die Mäuse wurden unter Standardbedingungen bei künstlichen 12-Stunden-Tag-und-Nacht-Rhythmus, 22°C ± 2°C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% im Tierstall des Instituts für Anatomie der Universität Rostock gehalten. Es bestand stets freier Zugang zum Trinkwasser und Standardfutter. Die Genotypisierung erfolgte durch Mitarbeiter des Anatomie-Instituts der Universität Rostock bis zum postnatalen Tag P7. Hierfür wurden am 6. Postnatalen Tag 1-2 mm der Schwänze biopsiert und im Albrecht-Kossel-Institut Rostock mittels PCR-Verfahren analysiert (s. Anhang: Genotypisierung). Anhand der Ergebnisse erfolgte die Trennung und Einteilung der Mäuse in acht Gruppen (Tabelle 1): 11 scheinbehandelte Kontrolltiere (sham-treated control/ NPC1^{+/+}), neun scheinbehandelte erkrankte Tiere (sham-treated mutant/NPC1^{-/-}), sieben Cyclodextrin behandelte homozygot gesunde Tiere (Cyclo-only treated control/ NPC1^{+/+}), sechs Cyclodextrin behandelte erkrankte Tiere (Cyclo-only treated mutant/ NPC1^{-/-}), sechs kombinationsbehandelte homozygot gesunde Tiere (Kombi treated control/ NPC1^{+/+}), sechs kombinationsbehandelte erkrankte Tiere (Kombi-treated mutant/ NPC1^{-/-}), einer Miglustat behandelten homozygot gesunden Maus (Miglu only treated control/ NPC1^{+/+}) und vier Miglustat behandelten erkrankten Tiere (Miglu-only treated mutant/ NPC1^{-/-}). Die Tiere verblieben bis P23 bei ihren Muttertieren und wurden von diesen gesäugt. Danach wurden die Mäuse in reine NPC1^{-/-} - und Kontrollgruppen eingeteilt und durch separate Käfige vom Ehret Typ II (207 mm x 140 mm x 265 mm) getrennt. Die Tiere erhielten im 24-Stunden-Intervall eine an ihren Bedarf angepasste Nahrungsmenge in Form von zu Puderfutter gemixten Pallets (Ssniff, Soest, Deutschland). In das Futter wurde ab Tag 23 sowohl für die Miglu-only- als auch für die Kombi-Mäuse das Medikament Miglustat eingemischt (Ssniff, Soest, Deutschland). Alle Experimente wurden durch die zuständige Landesbehörde Mecklenburg-Vorpommerns genehmigt (Genehmigungs-ID: 7221.3-1.1-030/12) und die Versuchsmäuse nach geltenden Richtlinien des Tierschutzrechts behandelt.

Tabelle 1: Einteilung erkrankter und gesunder Versuchstiere in Gruppen

Genotyp	unbehandelt	Cyclodextrin Monotherapie	Kombi-Therapie (Miglustat/Allopregnanolon/Cyclodextrin)	Miglustat Monotherapie
<i>NPCI</i> ^{+/+}	n=11	n=7	n=6	n=1
<i>NPCI</i> ^{-/-}	n=9	n=6	n=6	n=4

2.2 Pharmakologische Therapie

Im Rahmen der medikamentösen Therapie erfolgte die Applikation von Cyclodextrin (HP β CD) und Miglustat jeweils als Monotherapie sowie eine Substrat-Reduction- und By-Product-Replacement-Kombinationstherapie aus Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon (**Abbildung 7**).

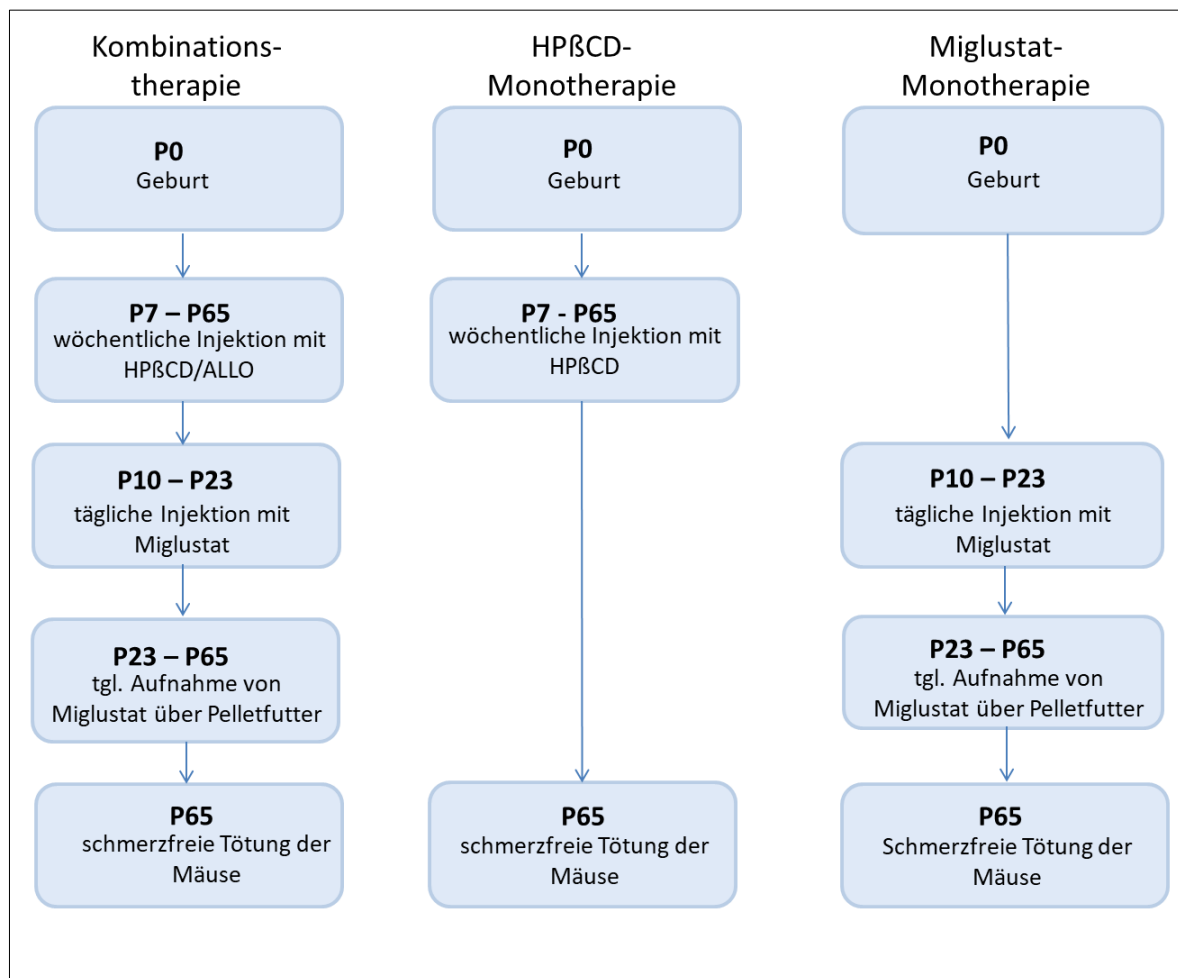


Abbildung 7: Schema zur Pharmakologischen Therapie

2.2.1 SRT/BPT-Kombinationstherapie

Bei der Kombinationstherapie erhielten die Tiere ab P7 wöchentliche Injektionen mit Cyclodextrin (HP β CD) (4000 mg/kg KG) und Allopregnanolon (25 mg/kg KG) bis zum Tod (P65). Zwischen P10 bis P23 bekamen die Mäuse täglich Miglustat (300 mg/kg KG) intraperitoneal injiziert und nahmen schließlich ab P23 täglich Miglustat (1200 mg/kg KG) peroral über ihr Pelletfutter auf.

2.2.2 Cyclodextrin-Monotherapie

Tiere, die monotherapeutisch mit Cyclodextrin (HP β CD) behandelt wurden, erhielten ab P7 bis P65 wöchentliche intraperitoneale Injektionen mit Cyclodextrin (4000 mg/kg KG).

2.2.3 Miglustat-Monotherapie

Die Mäuse erhielten zwischen P10 und P23 tägliche peritoneale Injektionen mit Miglustat (300mg/kg KG). Ab P23 nahmen sie Miglustat peroral über ihr Pelletfutter auf (1200 mg/kg KG).

2.2.4 Scheinbehandlung

Die scheinbehandelten (sham-treated) Tiere erhielten anstatt Arzneimittellapplikationen intraperitoneale Injektionen mit 0,9% NaCl. Diese erfolgten gleichzeitig zu den Cyclodextrin, Allopregnanolon bzw. den Miglustat-Injektionen der kombinationsbehandelten Mäuse.

2.2.5 Verwendete Pharmaka

Allopregnanolon:	CAS Nr.: 906-83-2 bezogen über Sigma Aldrich
Cyclodextrin:	CAS Nr.: 128446-35-5 bezogen über Sigma Aldrich
Miglustat (intraperitoneal):	CAS-Nr.: 72599-27-0 bezogen über Actelion Pharmaceuticals
Miglustat (peroral):	CAS Nr.: 72599-27-0 bezogen über Actelion Pharmaceuticals

2.3 Bestimmung des Körpergewichts der Versuchstiere

Am letzten Lebenstag erfolgte eine Gewichtsbestimmung der NPC1 Mäuse, um den Einfluss von Morbus Niemann-Pick Typ C1 auf etwaige Körpergewichtsveränderungen zu untersuchen. Nach vollständiger Perfusionsfixierung und Präparation wurden die Gehirne der Versuchstiere gewogen.

2.4 Histologische Aufarbeitung

2.4.1 Präparation und Gewebeaufarbeitung

Die Mäuse wurden am 65. postnatalen Tag mittels Isofluran betäubt und bekamen anschließend eine letale Dosis (0,1 ml auf 10 Gramm Körpergewicht) des „Mausmix—(Ketamin 100mg/ml) intraperitoneal injiziert. Nach Durchtrennung der Haut über dem Thorax und Abdomen wurde eine Thorakotomie durchgeführt und der Herzbeutel eröffnet. Im Anschluss wurde eine Perfusionskanüle in den linken Ventrikel eingeführt und das rechte Herzohr eröffnet. Die Spülung des vaskulären Systems erfolgte mit 25ml einer 4°C kalten 0,9%igen NaCl-Lösung mittels einer Rotationspumpe. Hiernach

erfolgte die Fixierung nach Bodian (Mulisch & Welsch, 2015), die eine gleichmäßige Strukturhaltung des Nervengewebes erlaubt und somit Voraussetzung für eine optimale quantitative Auswertung ist. Es wurden 50 ml auf 4°C gekühltes Bodian'sche Fixativ verwendet, bestehend aus 99-100%iger Essigsäure (CAS-Nr.: 64-19-7, JT Baker), 80%-igem Isopropanol (CAS-Nr.: 67-63-0, Chemosolute) und 37%iger-Formaldehydlösung (CAS-Nr.: 50-00-1, Merck) im Verhältnis von 1:18:1 (s. Anhang: Fixierung nach Bodian). Beim perfundierten Tier wurde daraufhin der Kopf vom Körper abgetrennt, die Haut und Muskulatur des Schädels abgetragen und letztlich das Gehirn vom restlichen Gewebe gelöst und gewogen. Anschließend wurde das Präparat in aufsteigender Alkoholreihe über 1,5 Tage entwässert, für 4h in Methylbenzoat (CAS-Nr.: 93-58-3, Merck) in geschlossenen Glasgefäßen und mit Mull bedeckt eingelegt und letztlich für 5h im Brutschrank bei 52-55°C in Paraffin (CAS-Nr.: 80002-74-2, Merck) ausgegossen. Die nun im Paraffinblock vorliegenden Präparate wurden in Serien von 20µm und im Winkel von 1 bis 5° am Mikrotom geschnitten und auf Gelatine-beschichtete Objektträger (SuperFrost, Menzel) aufgezogen. Diese wurden im nächsten Schritt auf eine Heizplatte gesteckt, abgetupft und anschließend weitere zwei bis drei Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

2.4.2 Färbung nach Nissl

Die Färbung nach Nissl ist eine histologische Färbetechnik, die sich besonders zur Darstellung von Nervengewebe eignet. Mithilfe basischer Farbstoffe werden negativ geladene Verbindungen wie DNA und RNA gebunden und so Nukleoli und Ribosomen angefärbt. In breiteren Dendriten lassen sich schollenartige chromatinhaltige Strukturen anfärben (Nissl-Schollen), die dem rauen endoplasmatischen Retikulum (Ergastoplasma) mit angelagerten Ribosomen entsprechen. Nach erfolgreicher Färbung erscheinen Perikaryon und Nucleolus dunkelblau und der Hintergrund blassrosa. Die angefertigten Paraffinschnitte werden zunächst getrocknet und mittels Xylol (CAS-Nr.: 1330-20-7, JT Baker) und absteigender Alkoholreihe (CAS-Nr.: 67-63-0, Carl Roth) entparaffiniert (Anhang: Histologische Färbung nach Nissl). Nach dreimaligen Abspülen mit Aquadest erfolgte die Färbung mit 0,1%iger Kresylviolett-Lösung (CAS-Nr.: 10510-54-0, Sigma Aldrich) bei 60° im Brutschrank. Nach einem weiteren Abspülen mit Aquadest wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe unter Mikroskopkontrolle differenziert und letztlich in Xylol (CAS-Nr.: 1330-20-7, JT Baker) eingebracht und mit Pertex (CAS-Nr.: 41-4012-00, Medite) eingedeckt.

2.5 Definition der untersuchten kortikalen Strukturen

Jedes ausgewertete Hirnareal wurde zu Beginn der Arbeit mittels des Mausatlas „Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates—(2019) anhand quantifizierbarer Merkmale definiert und die Begrenzungen zu umliegenden Strukturen festgelegt. Der individuellen Ausdehnung entsprechend, wurden für jedes Areal zehn bis zwanzig Schnitte ausgewertet. Der erste Schnitt entsprach dabei dem am weitesten anterior liegenden und vom umliegenden Gewebe abgrenzbaren Punkt des definierten Areals. In einem kontinuierlichen Abstand von 10 Schnitten, je 2 µm Schnittstärke, wurden die Hirnareale bis zu ihrem letzten posterioren Auftreten, bei dem noch eine klare Abgrenzung zum umgebenden Hirngewebe möglich war, bestimmt. Alle Areale wurden mithilfe eines Zeichen-Mikroskops der Marke Carl Zeiss auf einer Papieroberfläche vergrößert (33-fach) abgebildet und dessen Konturlinien aufgetragen. Im Anschluss wurden die Areale digitalisiert und die Flächen innerhalb ihrer Grenzlinien mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms „ImageJ—(Image Processing and Analysis in Java, Version 1.52, 2018) planimetrisch erfasst und bestimmt. Im Folgenden soll die arealspezifische Begrenzung mithilfe des digitalen „Allen Brain Atlas—(Allen Institute for Brain Science, 2020) nachgestellt und veranschaulicht werden.

2.5.1 Begrenzung von CA1 und CA3

Die Grenze zwischen CA1 und CA3 wurde mikroskopisch anhand ihrer sich unterschiedlich darstellenden Pyramidenzellschicht festgelegt. Während CA1 ein sehr dicht gepacktes und schmales Band aus Pyramidenzellen aufweist, ist das von CA3 aufgelockert und breit. CA1 weist zudem in der vorliegenden Nissl-Färbung kleinere und hellere Zellen als CA3 auf. Für beide Areale dienen die mikroskopisch sichtbaren Faserzüge des Alveus als kraniale Begrenzung. CA1 grenzt kaudal mit seinem Stratum lacunosum-moleculare an die Molekularzellschicht des Gyrus dentatus. Das Stratum oriens von CA3 grenzt kaudal, je nach Ausdehnung, anterior an Teile des Thalamus und posterior an Abschnitte des Nervus Opticus, der Pedunculi Cerebri oder des Gyrus dentatus. Die Areale CA2 und CA3 wurden in der vorliegenden Arbeit aus übersichtlichen Gründen und keinen wesentlichen funktionellen Unterschieden zu einem Hirnareal zusammengefasst und ausgewertet (Paxinos & Franklin, 2019).

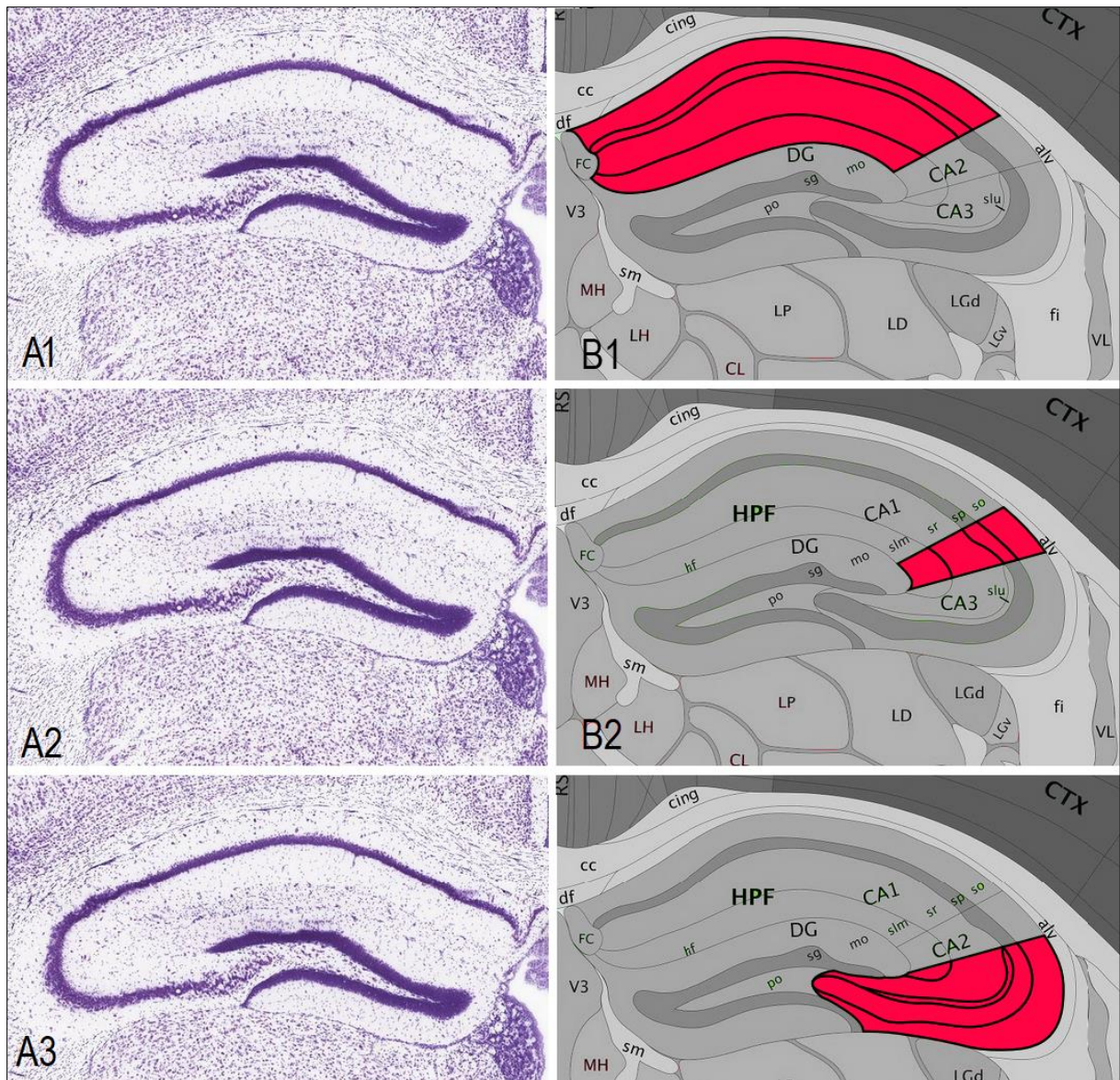


Abbildung 8: Begrenzung der Areale CA1, CA2 und CA3

Relevante Strukturen: HPF- Hippocampusformation, CA1 – Cornu Ammonis 1, CA2- Cornu Ammonis 2, CA3 – Cornu Ammonis 3, DG – Gyrus dentatus, so – Stratum oriens, sp – Stratum pyramidale, sr – Stratum radiatum, slm – Stratum lacunosum-moleculare, mo – Stratum moleculare, sg – Stratum granulosum, po – polymorphe Schicht, df – dorsale Fornix, alv – Alveus, fi – fimbria, CTX- cerebraler Cortex, cc – corpus callosum, V3 – dritter Ventrikel, sm – stria medullaris

- A1-A3: Hippocampusformation rechte Hirnhälfte in Nisslfärbung, Coronalchnitt
- B1: Markierung von CA1 in rot, linke Hirnhälfte
- B2: Markierung CA2 in rot, linke Hirnhälfte
- B3: Markierung von CA3 in rot, linke Hirnhälfte

Quelle: Allen Brain Atlas, 2020

2.5.2 Begrenzung des Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus zeichnet sich durch dicht gepackte Körnerzellen aus. Der Umriss wurde so gewählt, dass seine Lamina molecularis die äußere Begrenzung darstellt. Diese grenzt kranial an das Stratum lacunosum-moleculare von CA1 und kaudal an Teile des Nervus opticus. Die Verbindung der beiden Schenkel des Gyrus dentatus, bestehend aus Stratum granulosum und Stratum moleculare stellt dabei die Grenze zu CA3 dar.

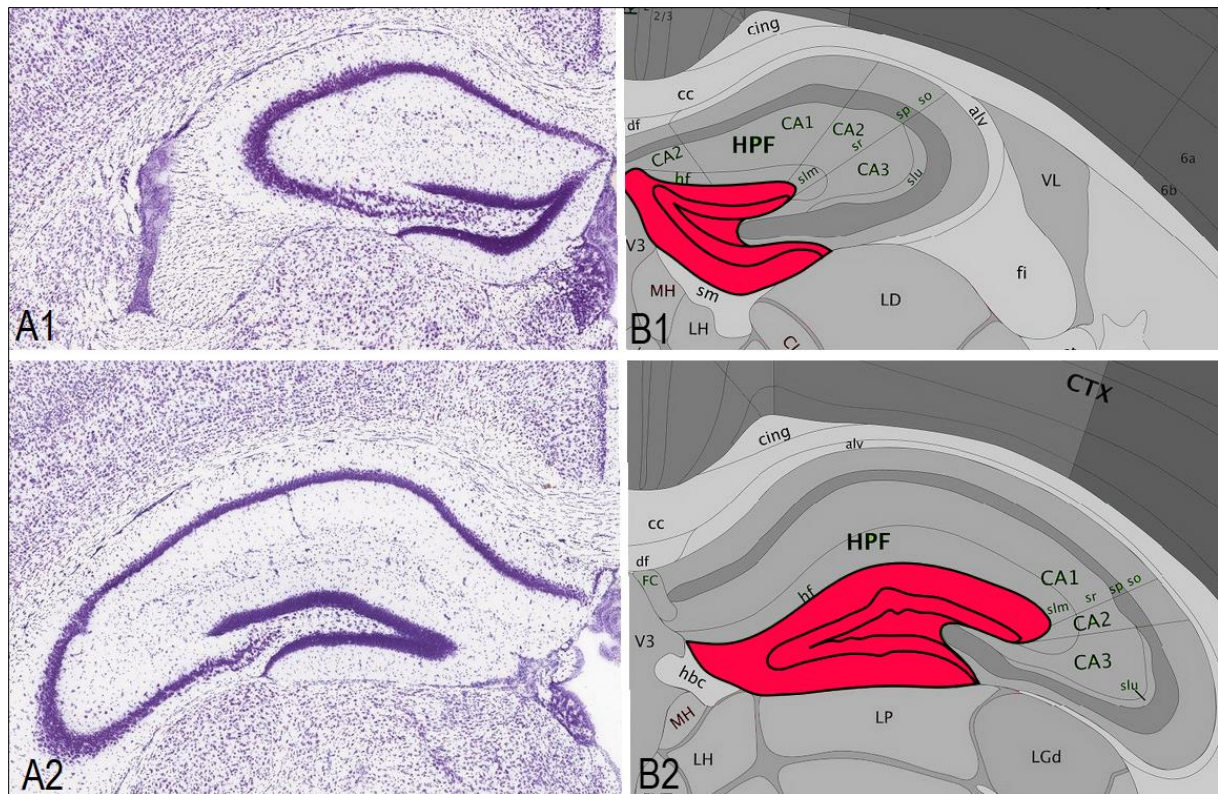


Abbildung 9: Begrenzung des Gyrus dentatus

Relevante Strukturen: HPF – Hippocampusformation, CA1 – Cornu Ammonis 1, CA2 – Cornu Ammonis 2, CA3 – Cornu Ammonis 3, so – Stratum oriens, sp – Stratum pyramidale, sr – Stratum radiatum, slm – Stratum lacunosum-moleculare, df – dorsale Fornix, alv – Alveus, fi – fimbria, CTX – cerebraler Cortex, cc – corpus callosum, V3 – dritter Ventrikel, sm – stria medullaris VL – lateraler Ventrikel, V3 – dritter Ventrikel

- A1: Hippocampusformation rechte Hirnhälfte in Nisslfärbung, anteriorer Coronalchnitt (AC)
- A2: Hippocampusformation rechte Hirnhälfte in Nisslfärbung, posteriorer Coronalchnitt (PC)
- B1: Markierung des Gyrus dentatus in rot, linke Hirnhälfte (AC)
- B2: Markierung des Gyrus dentatus in rot, linke Hirnhälfte (PC)

Quelle: Allen Brain Atlas, 2020

2.5.3 Begrenzung des Subiculus

Das Subiculum zeichnet sich durch eine breite Pyramidenzellschicht aus und hebt sich damit von umliegenden Feldern ab. Es grenzt direkt an CA1 und wird auch als Sommer-Sektor bezeichnet. Die kraniale Begrenzung wird durch die Pyramidenzellschicht des Subiculus gebildet. Diese steht in direktem Kontakt mit den Faserzügen des Alveus. Medial liegen das Prä- und Postsubiculum. Kaudal grenzt das Subiculum mit seiner Molekularzellschicht an den gut abgrenzbaren Gyrus dentatus.

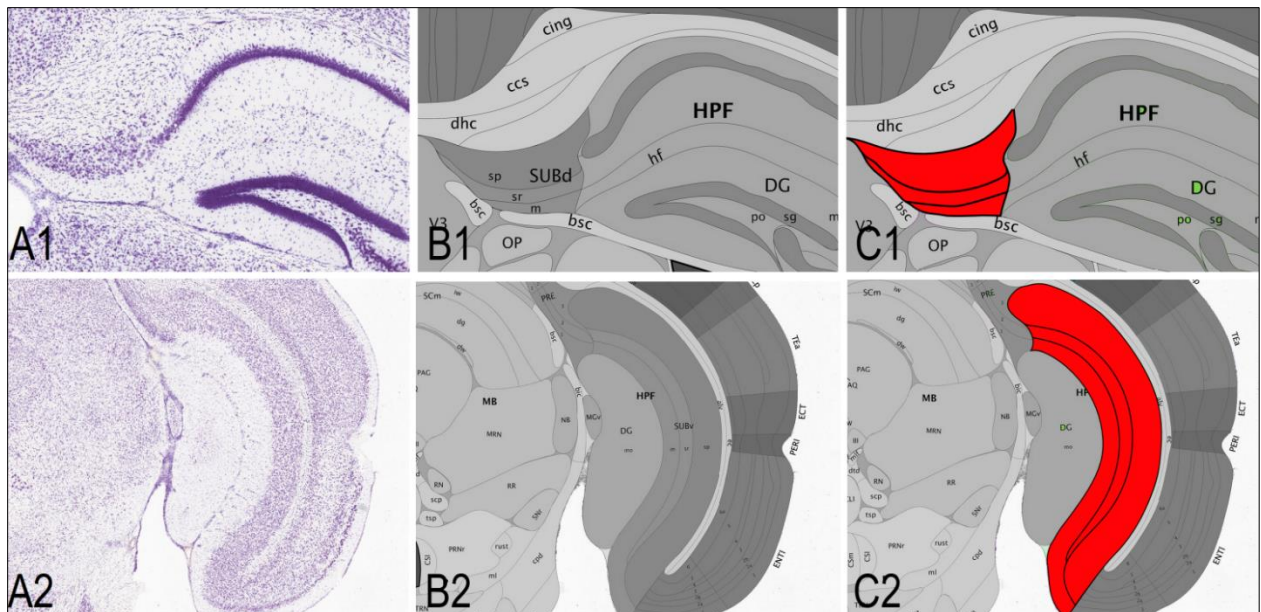


Abbildung 10: Begrenzung des Subiculus

Relevante Strukturen: HPF – Hippocampusformation, SUBv – Subiculum ventraler Part, SUBd – Subiculum dorsaler Part, sp – Stratum pyramidale, sr – Stratum radiatum, sm – Stratum moleculare, DG – gyrus dentatus, PRE – Präsubiculum, POST- Postsubiculum, alv – Alveus, dhc – dorsale hippocampus commissura, cc5 – corpus callosum splenium, bcs – brachium superior colliculus, cing - cingulum

- A1: Hippocampusformation mit Subiculum in Nissl-Färbung, linke Hirnhälfte (AC)
- A2: Hippocampusformation mit Subiculum in Nissl-Färbung, linke Hirnhälfte (PC)
- B1: Darstellung der Schichten Hippocampusformation und des Subiculus (AC)
- B2: Darstellung der Schichten Hippocampusformation und des Subiculus (PC)
- C1: Markierung Subiculum in rot, linke Hirnhälfte (AC)
- C2: Markierung Subiculum in rot, linke Hirnhälfte (PC)

Quelle: Allen Brain Atlas, 2020

2.5.4 Begrenzung des Para-, Prä- und Postsubiculus

Para-, Prä- und Postsubiculum wurden aus übersichtlichen Gründen und der Schwierigkeit einer genauen und reproduzierbaren Abgrenzung untereinander zusammengefasst. Sie lassen sich zusammengekommen deutlich von angrenzenden Strukturen wie Gyrus Dentatus, Subiculum und den Commissurenfasern der Fornix abgrenzen.

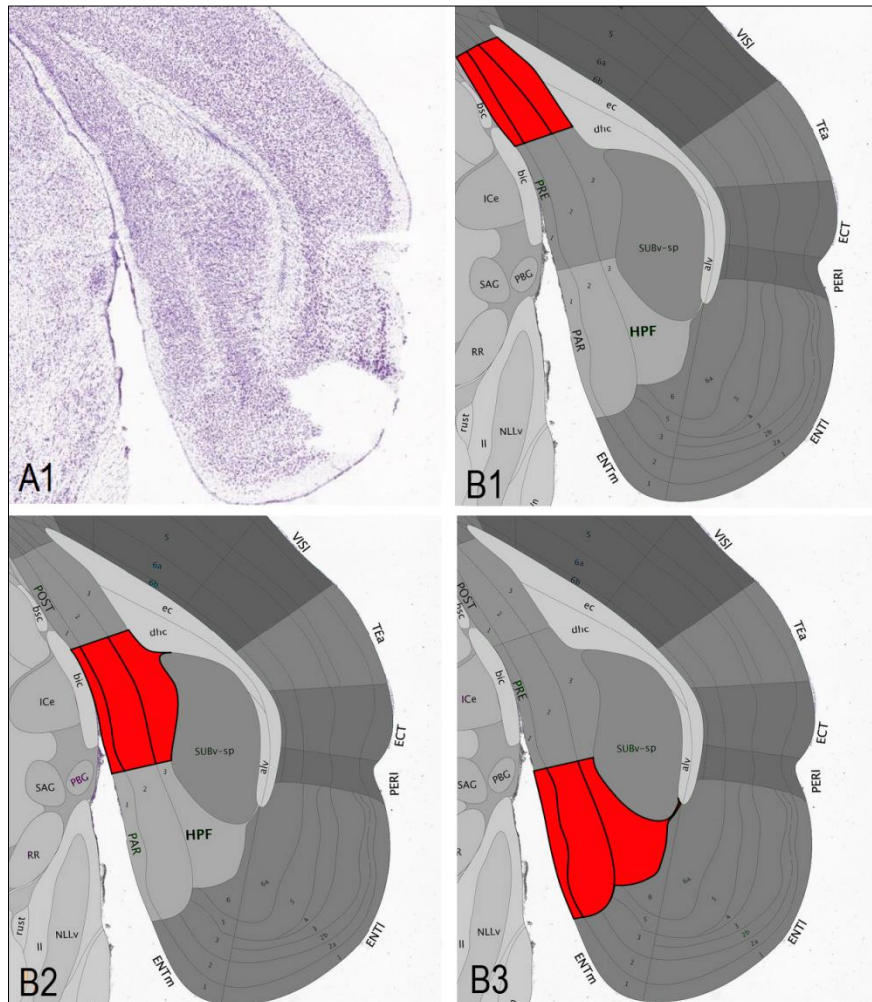


Abbildung 11: Begrenzung von Prä-, Post- und Parasubiculum

Relevante Strukturen: POST – Postsubiculum, PRE – Präsubiculum, PAR – Parasubiculum, HPF – Hippocampusformation, SUBV-sp – Subiculum ventraler Part Pyramidenzellschicht, dhc – dorsale Hippocampus commissura, ec – externe capsula, alv – Alveus

A1: Darstellung der Hippocampusformation mit Prä-, Para- und Postsubiculum in NisslFärbung, linke Hirnhälfte (PC)

B1-B3: Markierung des Post-, Prä- und Parasubiculums in rot, linke Hirnhälfte

Quelle: Allen Maus Atlas, 2020

2.5.5 Begrenzung der Area entorhinalis

Die Area entorhinalis liegt am medialen Rand des Temporallappens. Sie besteht aus mindestens sechs Schichten, die in bis zu zwölf Unterfelder gegliedert werden können. Zellinseln der Schicht pre- α erlauben es die Area entorhinalis makroskopisch durch warzenförmige Erhebungen vom umgebenden Gewebe abzugrenzen (Ulfing, 2008). Mikroskopisch stellen sowohl der Sulcus rhinalis, der piriforme Kortex und das Corpus amygdaloideum Begrenzungen der Area entorhinalis dar.

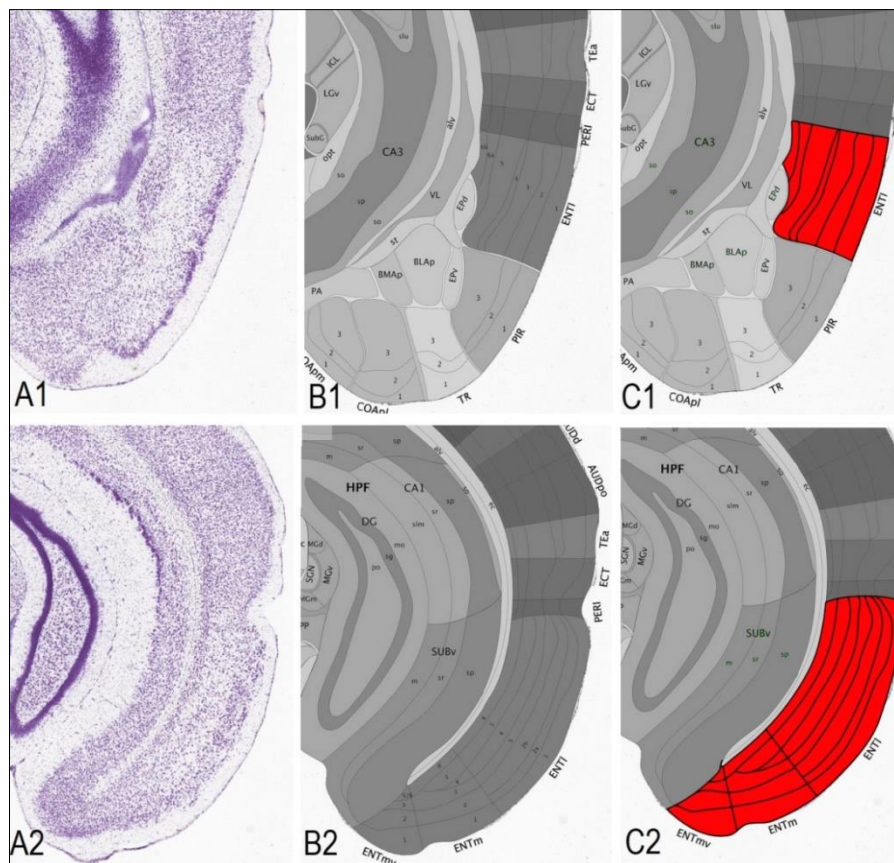


Abbildung 12: Begrenzung der Area entorhinalis

Relevante Strukturen: ENTl - Area entorhinalis lateraler Part, ENTm – Area entorhinalis medialer Part, ENTmv – Area entorhinalis medial ventrale Zone, PIR – piriformer Kortex, PERI – perirhinale Area, SUBv – Subiculum ventraler Part

- A1: Rindenareal der Area entorhinalis in Nisslfärbung, linke Hirnhälfte (AC)
- A2: Rindenareal der Area entorhinalis in Nisslfärbung, linke Hirnhälfte (PC)
- B1: Darstellung der Schichten der Area entorhinalis (AC)
- B2: Darstellung der Schichten der Area entorhinalis (PC)
- C1: Markierung der Area entorhinalis in rot (AC)
- C2: Markierung der Area entorhinalis in rot (PC)

Quelle: Allen Maus Atlas, 2020

2.5.6 Begrenzung des piriformen Kortex

Der piriforme Kortex lässt sich über sein charakteristisches dreischichtiges Zellband gut vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Das Rindenareal liegt zwischen dem Temporallappen und der Insula sowie anterolateral der Amygdala.

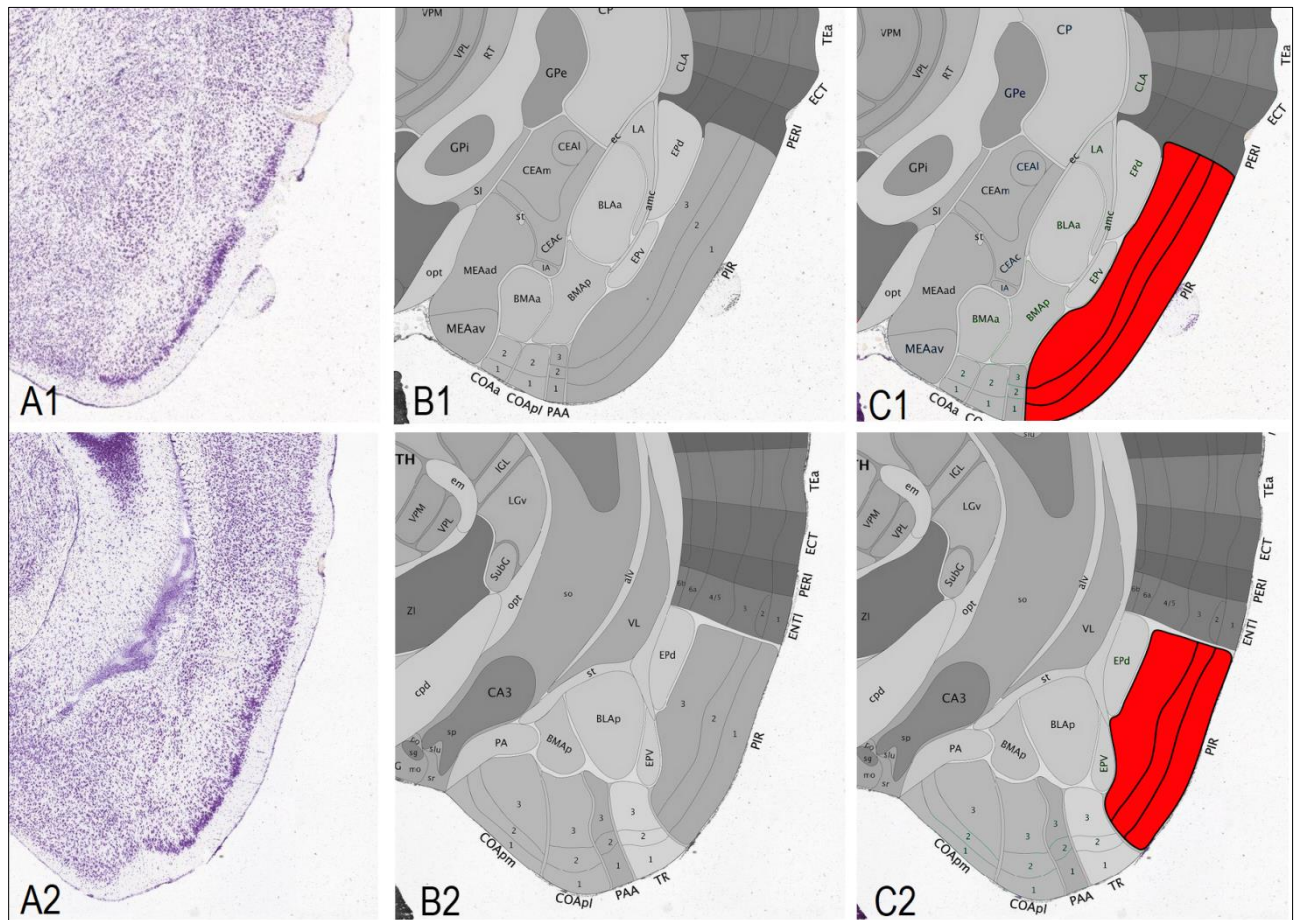


Abbildung 13: Begrenzung des Piriformen Kortex

Relevante Strukturen: PIR – Area piriformis, ENT – Area entorhinalis, lat – lateral olfactory tract, FS – Fundus des Striatums, CLA – Claustrum, PAA – piriform-amygdalar area, VL – laterale Ventrikel

- A1: Rindenareal des piriformen Kortex in Nisslfärbung, linke Hirnhälfte (AC)
- A2: Rindenareal des piriformen Kortex in Nisslfärbung, linke Hirnhälfte (PC)
- B1: Darstellung der Schichten des piriformen Kortex (AC)
- B2: Darstellung der Schichten des piriformen Kortex (PC)
- C1: Markierung des piriformen Kortex in rot (AC)
- C2: Markierung des piriformen Kortex in rot (PC)

Quelle: Allen Maus Atlas, 2020

2.6 Bestimmung der Volumina mit Hilfe der Cavalieri-Estimator-Methode

Jedes untersuchte Gehirn verliert durch histologische Aufarbeitung und dadurch bedingte Schrumpfung an Volumen. Um interindividuelle Vergleiche der Tiere zu ermöglichen, werden die Frischvolumina der Maushirne benötigt. Das Wiegen kleiner Hirnstrukturen ist schwer umzusetzen. Allerdings ist es möglich diese Strukturen mikroskopisch abzugrenzen und mittels der Bestimmung des individuellen Schnittvolumens und einem korrigierendem Schrumpfungsfaktor das Volumen zu berechnen. Dabei wird angenommen, dass alle Hirnteile im gleichen Maße schrumpfen. In der vorliegenden Arbeit zeigt sich, dass die Gesamtschrumpfung des Gehirns bei ungefähr 30 bis 48% liegt. Der maximale zu betrachtende Fehler bezüglich der Unterschätzung des Kortexvolumens ist mit weniger als fünf Prozent zu vernachlässigen (Wree, 1986). Der Schrumpfungsfaktor (SF) wird für jedes Gesamthirn separat bestimmt (s. Anhang: Gesamtübersicht der Versuchstiere) und ist der Quotient aus dem Schnittvolumen (SV), dem Volumen des Gehirns nach histologischer Aufarbeitung, und dem Frischvolumen (FV):

Formel 1: Berechnung des Schrumpfungsfaktors

$$SF = \frac{SV}{FV}$$

Das FV und das SV müssen bekannt sein oder bestimmt werden, um den SF berechnen zu können. Da erst die perfusionsfixierten Gehirne untersucht werden konnten, ließ sich das Frischvolumen nicht direkt bestimmen. Untersuchungen von Döring (1982) und Kretschmann (1974) ergaben allerdings, dass sich das Gewicht und das spezifische Gewicht fixierter Gehirne nicht vom Gewicht frischer Gehirne unterscheidet. Das FV des Gesamthirns kann somit berechnet werden, indem das Gewicht des fixierten Gehirns, das Hirnfrischgewicht, durch das spezifische Gewicht geteilt wird. Für das unfixierte Maushirn wurde ein spezifisches Gewicht von 1,033 g/ml bestimmt (Wingert, 1969). Dieser Wert gleicht dem spezifischen Gewicht des fixierten Gehirns (Kretschmann et al., 1982).

Formel 2: Berechnung des Frischvolumens

$$FV = \frac{\text{Hirnfrischgewicht}}{\text{spezifisches Gewicht}}$$

Das Schnittvolumen (SV), das Volumen des Gesamthirns nach histologischer Aufarbeitung, wurde nach folgender Formel berechnet:

Formel 3: Berechnung des Schnittvolumens

$$SV = (n + 1) \cdot SD \cdot \sum_{i=1}^N A_i$$

n: Anzahl der Schnitte zwischen zwei ausgewerteten Schnitten

SD: Schnittdicke in cm

N: Anzahl der planimetrisch bestimmten Schnitte

A_i: Fläche des i-ten planimetrierten Schnittes in mm²

Die Fläche A eines planimetrierten Schnittes wird dabei, nach Vergrößerung, durch Auftragen der Konturlinien mithilfe eines Zeichenmikroskop und nachfolgender Digitalisierung unter Zuhilfenahme des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ bestimmt.

Rechenbeispiel (Maus WT-Sham-2793) :

$$FV = FG / \text{spezifisches Gewicht}$$

$$FV = 0,474 \text{ g} / 1,033 \text{ g/ml}$$

$$FV = 0,459 \text{ ml} = 459 \text{ mm}^3$$

$$SV = (n + 1) \cdot SD \cdot \sum_{i=1}^N A_i$$

$$SV = (40 + 1) \cdot 0,02 \text{ mm} \cdot (A_1 + \dots + A_N) = \text{mm}^3$$

$$SF = SV/FV$$

$$F \quad \text{mm}^3 / 459 \text{ mm}^3 = 0,566$$

Die Schrumpfungsfaktoren wurden nach der oben angegebenen Formel für jedes Gehirn separat berechnet und liegen bei Werten zwischen 0,527 und 0,697. Im nächsten Schritt wird jedes Schnittvolumen eines Maushirns durch den entsprechenden Schrumpfungsfaktor dividiert und ergibt so das Frischvolumen des Gesamthirns.

2.6.1 Bestimmung des Frischvolumens eines definierten Areals

Es wird die gleiche Formel, mit der auch das Schnittvolumen des Gesamthirns berechnet wurde, verwendet. Am Beispiel von CA1 der Maus WT-Sham 2793, soll erklärt werden wie das Volumen eines definierten Hirnareals bestimmt wurde. Das Areal CA1 erstreckt sich über ungefähr 150 je 20 µm dicke Schnitte, sodass für eine sichere Berechnung 10 bis 15 Schnitte im gleichem Abstand zueinander ($n = 9$) ausgewertet wurden. Dies entspricht jedem zehnten Schnitt ($n+1$). (Zilles et al., 1982). Mithilfe eines Carl Zeiss Zeichenmikroskops wird das vorher definierte Areal auf Papier vergrößert (33-fach) abgebildet und dessen Konturlinien aufgetragen und im Anschluss mit einem HP OfficeJetPro Scanner digitalisiert. Mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ werden die Schnittflächen des Areals bestimmt.

Rechenbeispiel CA1 (WT Sham 2793):

$$SV = (9 + 1) * 0,02 \text{ mm} * (A_1 + \dots + A_N) = 2,424 \text{ mm}^3$$

$$SF = 0,566$$

$$SF = SV / FV$$

$$FV = 2,424 \text{ mm}^3 / 0,566 = 4,283 \text{ mm}^3$$

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Software SigmaPlot 14 (Systat Software, Inc. San Jose, CA 95110, USA). Mittels des statistischen Signifikanztests „Shapiro-Wilk—wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft und p-Werte $> 0,050$ als normalverteilt betrachtet. Zur Analyse der Abweichungen von Gruppen-Medianen wurde der Brown-Forsythe-Test durchgeführt. Eine Varianzhomogenität wurde bei p-Werten $> 0,050$ bestätigt. Bei normalverteilten Daten erfolgte die Durchführung der Zweiweg-ANOVA (Analysis of Variance). Zeigten sich signifikante Unterschiede, erfolgte im Anschluss der Post-hoc-Test nach Holm-Sidak. Dieser gibt durch paarweise Mittelwertvergleiche Auskunft darüber, ob sich die Mittelwerte signifikant ($p \leq 0,05$) voneinander unterscheiden. In dieser Arbeit werden alle Daten als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz (p) wird folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit geben Aufschluss über die volumetrischen Veränderungen limbischer Kortextareale im NPC1-Mausmodell unter drei verschiedenen Therapieregimen und der Scheinbehandlung. Dafür wurden sowohl gesunde ($NPC1^{+/+}$) als auch erkrankte Tiere ($NPC1^{-/-}$) therapiert und untersucht.

3.1 Normalverteilung der Schrumpfungsfaktoren

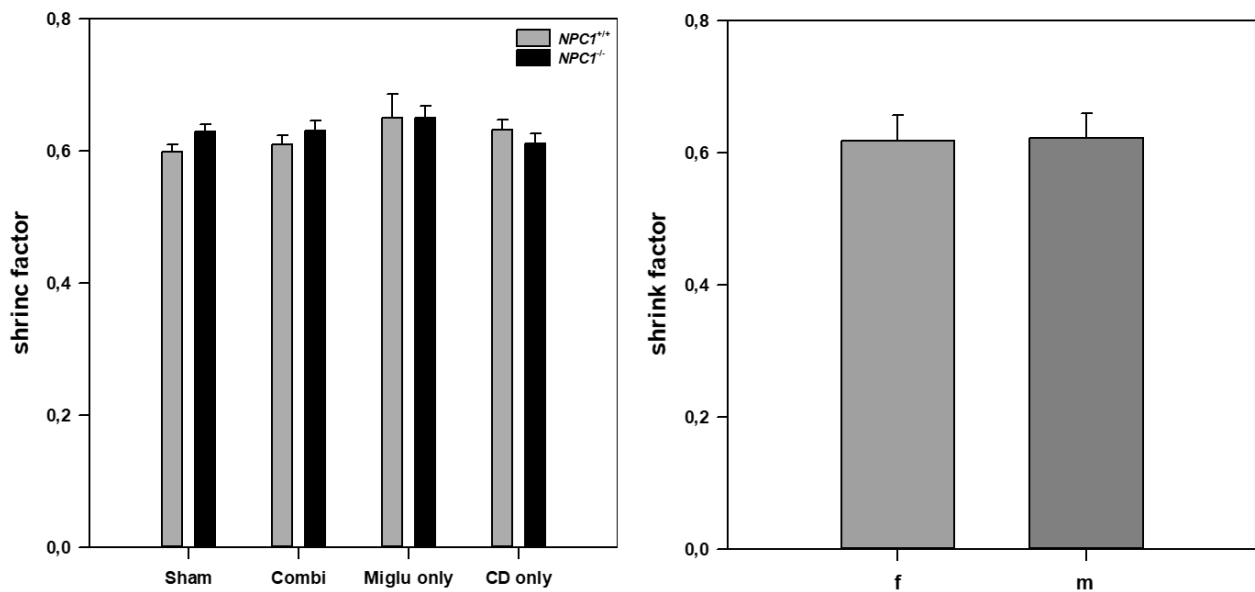


Abbildung 14: Darstellung der normalverteilten Schrumpfungsfaktoren

shrink factor – Schrumpfungsfaktor, *f* – female, *m* – male, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe. Die Schrumpfungsfaktoren sind normalverteilt. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Geschlecht, dem Genotypus oder der Behandlung innerhalb der Schrumpfungsfaktoren.

Die Schrumpfungsfaktoren zeigen nach Shapiro-Wilk-Test mit $p = 0,298$ und Brown-Forsythe-Test mit $p = 0,220$ eine Normalverteilung. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Genotyp ($p = 0,553$; **Tabelle 2**, **Abbildung 14** links), dem Geschlecht ($p = 0,698$; **Tabelle 3**, **Abbildung 14** rechts) oder der Behandlungsgruppe ($p = 0,430$; **Tabelle 4**, **Abbildung 14** links).

Tabelle 2: Mittelwerte der SF innerhalb der Genotypen

Gruppe	Mittelwert der SF	Standardabweichung
$NPC1^{+/+}$	0,622	0,0316
$NPC1^{-/-}$	0,630	0,0412

SF – Schrumpfungsfaktorm, $p = 0,553$

Tabelle 3: Mittelwerte der SF innerhalb des Geschlechts

Gruppe	N	Mittelwert der SF	Standardabweichung
f	21	0,618	0,0386
m	28	0,622	0,0372

f – female, *m* – male, *N* – Anzahl der Messwerte, *SF* – Schrumpfungsfaktor, *p* = 0,698

Tabelle 4: Mittelwerte der SF innerhalb der Behandlungsgruppen

Gruppe	Mittelwert der SF	Standardabweichung
Sham	0,613	0,0445
Kombi	0,620	0,0201
Miglu only	0,650	0,0301
CD only	0,622	0,0380

Sham – scheinbehandelte Gruppe, *Kombi* – kombinationsbehandelte Gruppe, *Miglu only* – Miglustat monotherapierte Gruppe, *CD only* – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe, *SF* – Schrumpfungsfaktor, *p* = 0,430

3.2 Daten der Hirn- und Körpergewichte

3.2.1 Reduziertes Körpergewicht bei NPC1^{-/-} im Vergleich zu NPC1^{+/+}

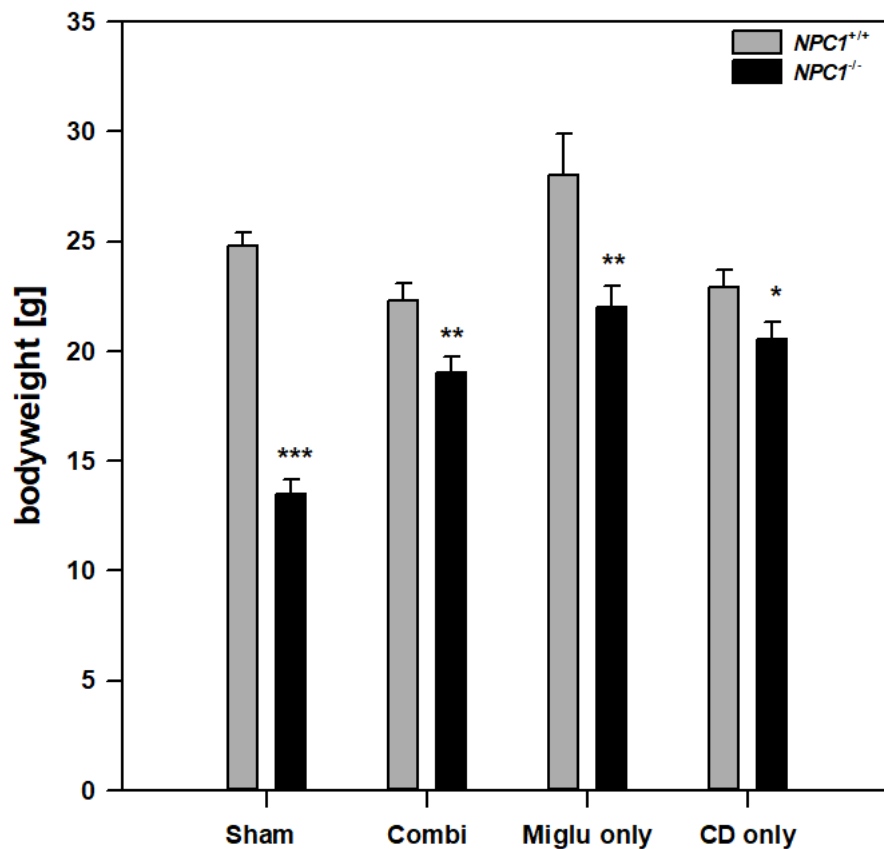


Abbildung 15: Darstellung zur Verteilung des Körpergewichts innerhalb der Therapiegruppen

bodyweight – Körpergewicht, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe
Im Betracht auf die Körpergewichte gesunder und erkrankter Versuchstiere ist ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) innerhalb der scheintherapierten Gruppe zu beobachten. Innerhalb der NPC1^{+/+} Gruppe zeigt sich ein Gesamtkörpergewicht von 24,826g gegenüber der NPC^{-/-} Gruppe mit 13,511g. Alle drei Therapiegruppen zeigen ein signifikant höheres Körpergewicht der behandelten NPC1^{-/-} Mäuse gegenüber der NPC1^{-/-} Kontrollgruppe.

Das Körpergewicht der scheinbehandelten NPC1^{-/-} Versuchstiere ($13,511 \pm 2,568\text{g}$) zeigt sich um 45,6% signifikant reduziert gegenüber gesunder NPC1^{+/+} Mäuse ($24,826 \pm 1,386\text{g}$; $p < 0,001$). Unter Kombinationstherapie zeigte sich, verglichen mit der nicht therapierten Kontrollgruppe, ein signifikant erhöhtes Körpergewicht um 40,6% ($p < 0,001$) bei den erkrankten Versuchstieren ($19,00 \pm 1,643\text{g}$). Auch die Cyclodextrin Monotherapie ließ erhöhte Messwerte des Körpergewichts bei der NPC1^{-/-} Gruppe ($20,550 \pm 2,217\text{g}$) im Vergleich zu den scheinbehandelten NPC1^{-/-} Mäusen beobachten (+52,1%; $p < 0,001$). Die Miglustat Monotherapie zeigte einen signifikanten Anstieg des Körpergewichts um 62,8% ($p < 0,001$) bei den behandelten NPC1^{-/-} Mäusen ($22,0 \pm 1,633\text{g}$) im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe. Die Therapieregime unterscheiden sich in ihrer Wirkung nicht

signifikant (Miglu/Kombi: $p = 0,003$; Miglu/CD: $p = 0,027$; CD/Kombi: $p = 0,170$). Das Körpergewicht der Cyclodextrin monotherapierten NPC1^{+/+} Mäuse ($22,917 \pm 1,530$ g; $p < 0,001$) reduzierte sich im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe, der unbehandelten NPC1^{+/+} Versuchstiere ($24,826 \pm 1,386$) nicht signifikant ($p = 0,154$; -7,6%). Mit einem 12,8% höheren Körpergewicht zeigten die Miglustat monotherapierten NPC1^{+/+} - Mäuse (28,00 g) keine signifikante Differenz zu der Kontrollgruppe ($24,826 \pm 1,386$; $p = 0,221$). Die Kombinationstherapie ($22,33 \pm 1,472$ g) zeigte ein um 10% verringertes Gewicht gegenüber der Kontrollgruppe ($p = 0,065$). Die Therapien untereinander lassen keinen signifikanten Wirkunterschied beobachten (Miglu/Kombi: $p = 0,050$; Miglu/CD: $p = 0,068$; CD/Kombi: $p = 0,598$) (**Abbildung 15, Tabelle 5**).

Tabelle 5: Vergleiche der Körpergewichte

Gruppe1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{-/-} Sham	- 45,6	< 0,001
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} CD only	+ 52,1	< 0,001
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Miglu only	+ 62,8	< 0,001
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 40,6	< 0,001
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} CD only	- 7,6	0,154
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Miglu only	+ 12,8	0,221
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Kombi	- 10	0,065
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} Kombi	- 13,6	0,003
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} CD only	- 6,6	0,027
NPC1 ^{-/-} CD only	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 7,5	0,17
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} Kombi	- 20,2	0,050
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} CD only	- 18,2	0,068
NPC1 ^{+/+} CD only	NPC1 ^{+/+} Kombi	- 2,5	0,598

Sham – Scheinbehandlung; CD only – Cyclodextrin Monotherapie, Miglu only – Miglustat – Monotherapie, Kombi – Kombinationsbehandlung

3.2.2 Reduziertes Gehirngewicht bei NPC1^{-/-} im Vergleich zu NPC1^{+/+}

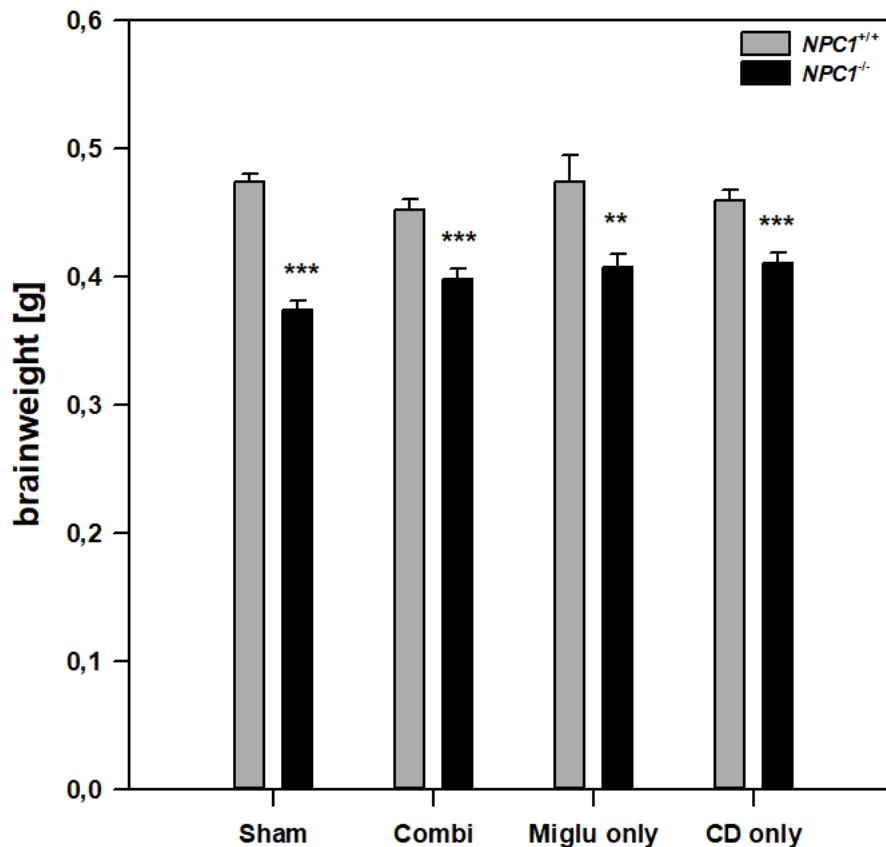


Abbildung 16: Darstellung zur Verteilung der Hirngewichte innerhalb der Gruppen

brainweight – Hirnfrischgewicht, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe

Im Betracht auf die Hirngewichte innerhalb der scheinbehandelten Gruppe ist ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen dem der NPC1^{+/+} Gruppe mit 0,474 g gegenüber dem der NPC1^{-/-} Gruppe mit 0,374 g. Unter Cyclodextrin-Monotherapie war ein signifikant höheres Hirngewicht der behandelten NPC1^{-/-} Mäuse im Vergleich zur erkrankten Kontrollgruppe zu beobachten ($p = 0,013$).

Erkrankte unbehandelte Versuchstiere ($0,374 \pm 0,016\text{g}$) lassen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ($0,474 \pm 0,014\text{g}$) statistisch signifikant geringere Messwerte ($p < 0,001$) beobachten. Damit zeigen die erkrankten Tiere gegenüber der NPC1^{+/+} Kontrollgruppe ein um 21,9 % reduziertes Hirngewicht. Innerhalb der erkrankten Gruppen lässt sich unter Kombi-Therapie ($0,398 \pm 0,028\text{g}$) eine reduzierte Hirngewichtsabnahme von 2,4% ($p = 0,143$) nachweisen. Die Miglu only Therapie ($0,408 \pm 0,016\text{g}$) erbrachte um 9,1% erhöhte Messwerte innerhalb der erkrankten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p = 0,058$). Auch unter der CD only Therapie ($0,411 \pm 0,037\text{g}$) war eine verminderte Gehirngewichtsabnahme von 9,9% zu beobachten ($0,013$). Keine Therapie erbrachte signifikante Unterschiede innerhalb der erkrankten Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Therapien untereinander lassen innerhalb der NPC1^{-/-} Versuchsgruppe keine

signifikanten Differenzen beobachten (CD/Kombi: $p = 0,671$; Miglu/Kombi: $p = 0,738$, CD/Miglu only: $p = 0,826$). Auch beim Vergleich gesunder Kontrolltiere ($0,474 \pm 0,014$) zur Kombinations- ($0,452 \pm 0,012$; $p = 0,260$) oder zur Cyclodextrinmonotherapie ($0,459 \pm 0,019$; $p = 0,622$) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Genauso wenig zeigte die Miglustatmonotherapie ($0,474$ g; $p = 1,000$) einen signifikanten Messwertunterschied im Vergleich zur untherapierten Kontrollgruppe. Auch die Therapieformen untereinander wiesen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Wirkung auf (Miglu/Kombi: $p = 0,817$; Miglu/CD: $p = 0,891$; CD/Kombi: $p = 0,813$) (**Abbildung 16** Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden., **Tabelle 6**).

Tabelle 6: Vergleiche der Hirngewichte

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	- 21,9	< 0,001
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	+ 9,9	0,013
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	+ 9,1	0,058
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 2,4	0,143
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	- 3,2	0,622
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	± 0	1,000
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	- 4,6	0,260
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	- 2,4	0,738
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	+ 0,7	0,826
<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	- 3,2	0,671
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	- 6,8	0,817
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	- 3,2	0,891
<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	- 1,5	0,813

Sham – Scheinbehandlung; *CD only* – Cyclodextrin Monotherapie, *Miglu only* – Miglustat – Monotherapie, *Kombi* – Kombinationsbehandlung

3.2.3 Hirn-/Körpergewicht-Quotient erhöht bei scheinbehandelten NPC^{-/-} Mäusen

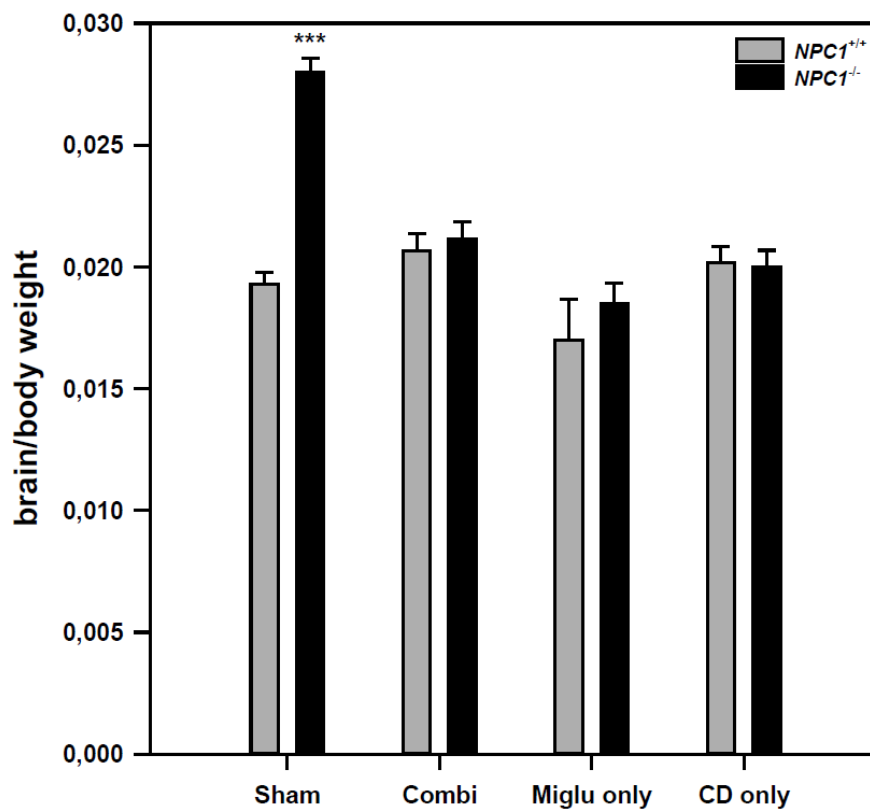


Abbildung 17: Darstellung des Hirn-/Körpergewicht-Quotienten innerhalb der Versuchsgruppen

brainweight – Hirnfrischgewicht, bodyweight – Körpergewicht Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe. Bei Betrachtung des Quotienten aus Hirn- und Körpergewicht, zeigt sich dieser innerhalb der scheintherapierten NPC^{-/-} Gruppe erhöht gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Innerhalb der Therapiegruppen zeigten sich kein statistisch signifikanten Unterschiede.

Bei Betrachtung des Quotienten aus Hirn- und Körpergewicht, zeigt sich dieser innerhalb der scheintherapierten NPC^{-/-} Gruppe gegenüber dem der Kontrollgruppe erhöht. Während die scheinbehandelten NPC^{+/+} Mäuse einen Quotienten von 0,019 aufweisen, zeigen die erkrankten Tiere ein Verhältnis von Hirn- zu Körpergewicht von 0,028. Damit ist der Quotient bei den NPC^{-/-} Mäusen gegenüber ihren gesunden scheinbehandelten Kontrolltieren um 47,4% ($p < 0,001$) erhöht. Innerhalb der Therapiegruppen lässt sich kein signifikanter Unterschied nachweisen (**Abbildung 17, Tabelle 7**)

Tabelle 7: Vergleich des Quotienten aus Hirn- und Körpergewicht innerhalb der Sham-Gruppe

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{-/-} Sham	+ 47,4	< 0,001

Sham – scheintherapierte Gruppe

3.3 Ergebnisse der Volumenvermessung

3.3.1 Volumen von CA1 bei NPC1^{-/-} gegenüber NPC1^{+/+} reduziert

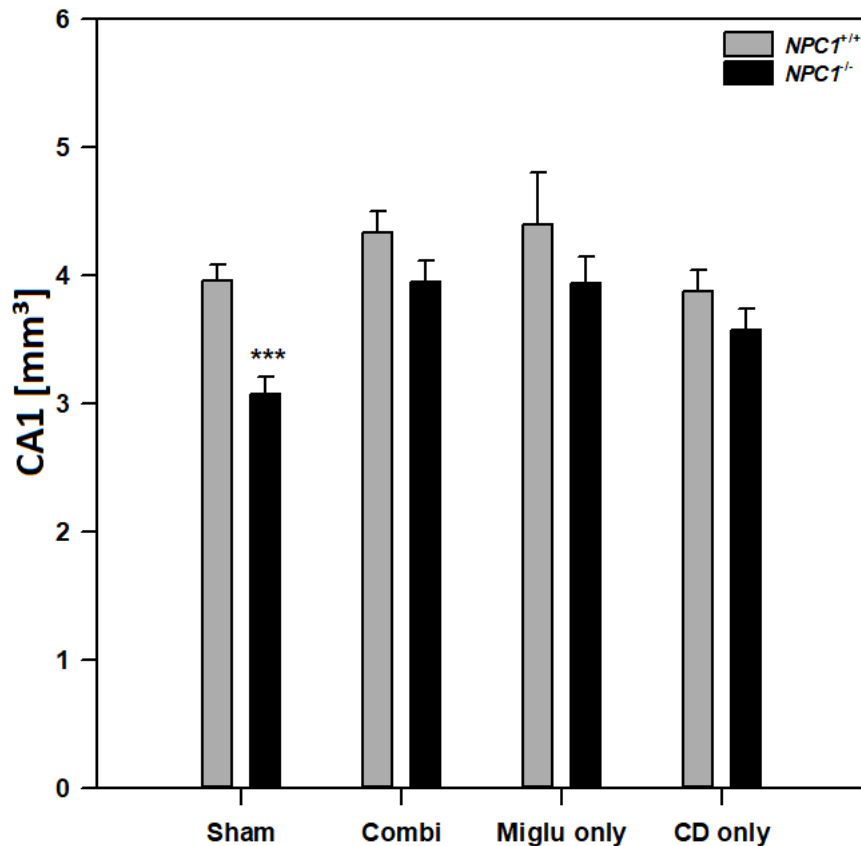


Abbildung 18: Darstellung zur Verteilung der Volumina von CA1 innerhalb der Versuchsgruppen

CA1 – Cornu Ammonis Region 1, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe. Innerhalb der scheintherapierten Gruppe ist ein statistisch signifikanter Unterschied des CA1-Volumens zwischen der gesunden und erkrankten Versuchstiere ($p < 0,001$) zu beobachten. Die NPC1^{+/+} Gruppe zeigt Werte von $3,962 \text{ mm}^3$ gegenüber der NPC1^{-/-} Gruppe mit lediglich $3,071 \text{ mm}^3$. Innerhalb der Therapiegruppen zeigen die behandelten NPC1^{-/-} Mäuse reduzierte Volumenabnahmen im Vergleich zu ihrer erkrankten Kontrollgruppe, wobei die Differenz der Messdaten sowohl bei der Kombinationstherapie ($p = 0,001$) als auch bei der Miglustat-Monotherapie ($p = 0,005$) statistisch signifikant sind.

Beim Vergleich der CA-1 Volumina zwischen den Gruppen zeigen sich um 22,5% signifikant ($p < 0,001$) geringere Messwerte erkrankter scheinbehandelter NPC1^{-/-} Tiere ($3,071 \pm 0,178 \text{ mm}^3$) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ($3,962 \pm 0,359 \text{ mm}^3$). Unter der Kombi- ($3,956 \pm 0,669 \text{ mm}^3$; +28,5%; $p = 0,001$) und Miglustattherapie ($3,940 \pm 0,516$; +28,3%, $p = 0,005$) können innerhalb der erkrankten Versuchstiere signifikant erhöhte Werte gegenüber ihrer untherapierten Kontrollgruppe beobachtet werden. Auch die Cyclodextrin Monotherapie zeigt eine verminderte Volumenabnahme innerhalb der NPC1^{-/-} Versuchstiere im Vergleich zur NPC1^{+/+} Kontrollgruppe ($3,577 \pm 0,416 \text{ mm}^3$; +16.5%; $p = 0,090$). Zwischen den drei Therapieregimen lässt

sich innerhalb der NPC1^{-/-} Gruppe kein signifikanter Unterschied beobachten (Miglu/Kombi: p = 0,981; Miglu/CD: p = 0,319 ; CD/Kombi; p = 0,327). Behandelte Npc1^{+/+} Mäuse zeigen keinen signifikanten Volumenunterschied in CA1 im Vergleich zu ihren unbehandelten, gesunden Kontrolltieren. Auch die Therapien untereinander zeigen innerhalb der NPC1^{+/+} Versuchsgruppe keine signifikanten Messwertdifferenzen (**Abbildung 18, Tabelle 8**).

Tabelle 8: Vergleiche der Volumina von CA1

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{-/-} Sham	- 22,5	< 0,001
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} CD only	+ 16,5	0,090
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Miglu only	+ 28,3	0,005
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 28,5	0,001
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} CD only	- 2,3	0,887
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Miglu only	+ 11,0	0,669
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 9,3	0,345
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 0,2	0,981
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} CD only	- 9,2	0,319
NPC1 ^{-/-} CD only	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 10,3	0,327
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} Kombi	- 1,6	0,876
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} CD only	- 12,0	0,659
NPC1 ^{+/+} CD only	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 11,9	0,298

Sham – Scheinbehandlung; CD only – Cyclodextrin Monotherapie, Miglu only – Miglustat – Monotherapie, Kombi – Kombinationsbehandlung

3.3.2 Keine signifikanten volumetrischen Unterschiede in CA3

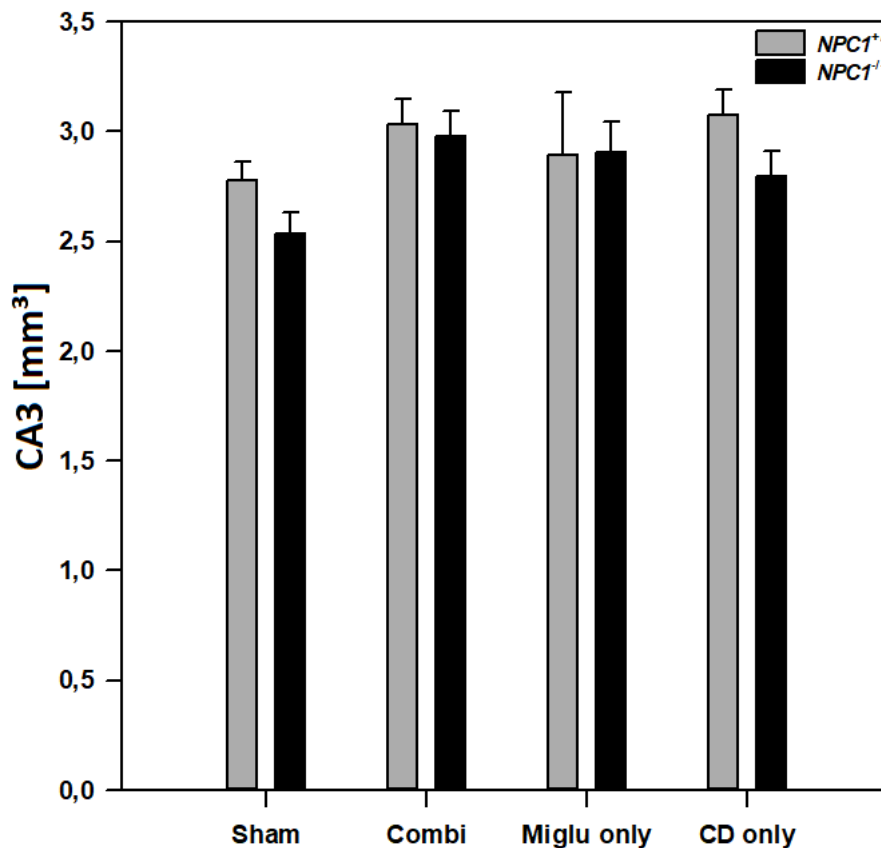


Abbildung 19: Darstellung zur Verteilung der Volumina in CA3 in den verschiedenen Gruppen

CA3 – Cornu Ammonis Region 3, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe

Innerhalb der scheintherapierten Gruppe sind statistisch nicht signifikante Unterschiede ($p = 0,068$) zwischen den CA3-Volumina der NPC1^{-/-} Versuchsgruppe ($2,536 \text{ mm}^3$) und der NPC1^{+/+} Kontrollgruppe ($2,776 \text{ mm}^3$) zu beobachten. Auch innerhalb der Therapiegruppen zeigten sich leichte volumetrische Unterschiede.

Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter ($p = 0,068$) Volumenunterschied von 8,6% in CA3 zwischen der NPC1^{-/-} Versuchsgruppe ($2,536 \pm 0,240 \text{ mm}^3$) und der NPC1^{+/+} Kontrollgruppe ($2,776 \pm 0,340 \text{ mm}^3$). Weder eine Cyclodextrin- ($2,797 \pm 0,270$; +10,3%; $p = 0,311$) noch eine Miglustat-Monotherapie ($2,903 \pm 0,230 \text{ mm}^3$; +14,5%; $p = 0,175$) führten zu signifikanten Volumendifferenzen innerhalb der NPC1^{-/-} Versuchsgruppe. Die Kombinationstherapie ($3,033 \pm 0,340 \text{ mm}^3$; $p = 0,033$) zeigt einen statistisch gering signifikanten Volumenunterschied innerhalb der NPC1^{-/-} Versuchsgruppe von 17,3% gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Zwischen den einzelnen Therapien konnte innerhalb der NPC1^{-/-} Gruppe kein signifikanter Unterschied der Messwerte nachgewiesen werden (Miglu/Kombi: $p = 0,636$; Miglu/CD: $p = 0,813$; CD/Kombi: $p = 0,636$). Die Therapien innerhalb der NPC1^{+/+} Gruppe zeigten im Vergleich zu den scheintherapierten gesunden Tieren ($2,776 \pm 0,340 \text{ mm}^3$)

keine signifikanten Volumenunterschiede (Cyclodextrin-Monotherapie: $3,073 \pm 0,31 \text{ mm}^3$; +10,7%; $p = 0,249$ / Kombitherapie: $3,033 \pm 0,230 \text{ mm}^3$; +9,3%; $p=0,349$ / Miglustat-Monotherapie: $2,893 \text{ mm}^3$; +4,2%; $p = 0,907$). Auch die Therapien untereinander zeigten keine signifikanten Unterschiede der Messwerte (**Abbildung 19, Tabelle 9**).

Tabelle 9: Vergleiche der Volumina in CA3

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	- 8,6	0,068
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	+ 10,3	0,311
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	+ 14,5	0,175
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 17,3	0,033
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	+ 10,7	0,249
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	+ 4,2	0,907
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	+ 9,3	0,349
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 2,5	0,698
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	- 3,6	0,813
<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 6,4	0,636
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	+ 4,8	0,958
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	+ 6,2	0,964
<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	- 1,3	0,812

Sham – Scheinbehandlung; *CD only* – Cyclodextrin Monotherapie, *Miglu only* – Miglustat – Monotherapie, *Kombi* – Kombinationsbehandlung

3.3.3 Signifikante Veränderungen des Gyrus dentatus in der Sham-Versuchsgruppe

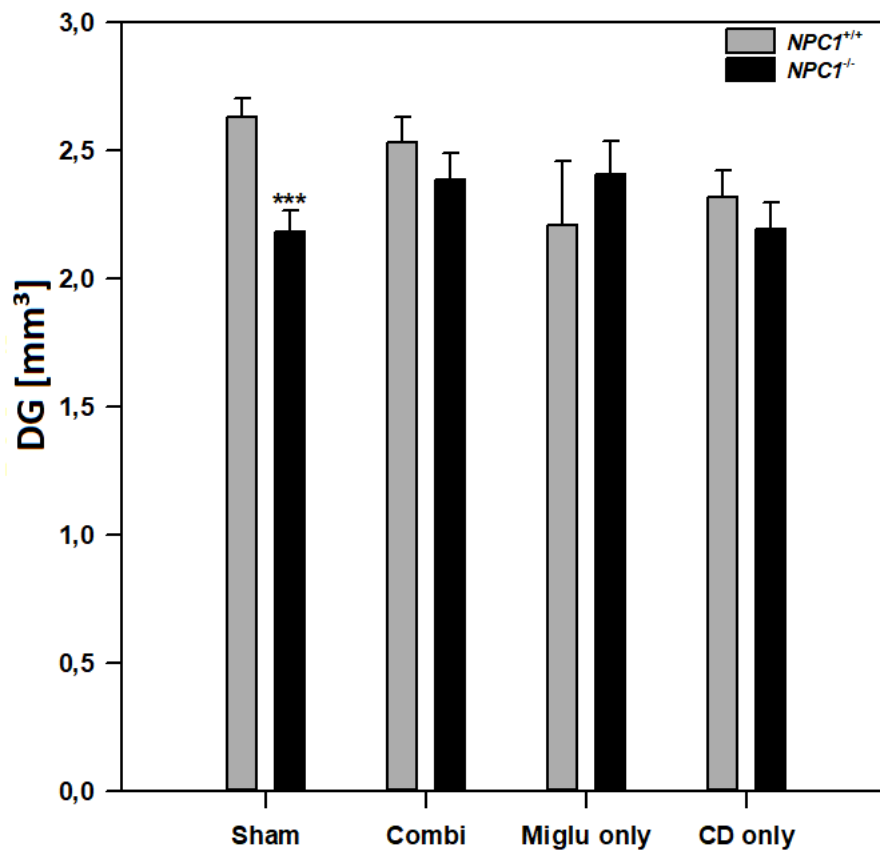


Abbildung 20: Volumetrische Unterschiede im Gyrus dentatus innerhalb der Versuchsgruppen

DG – Gyrus dentatus, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe. Innerhalb der scheintherapierten Versuchsgruppen zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) der Messdaten zwischen der NPC1^{+/+} Gruppe (2,628 mm³) und der NPC1^{-/-} Kontrollgruppe (2,184 mm³). Innerhalb der Therapiegruppen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der erkrankten NPC1^{-/-} Versuchstiere und ihrer gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

Die scheinbehandelten NPC1^{-/-} Mäuse ($2,184 \pm 0,210$ mm³) zeigen gegenüber ihrer NPC1^{+/+} Kontrollgruppe ($2,626 \pm 0,280$ mm³) um 16,9 Prozent signifikant reduzierte Messwerte ($p < 0,001$). Weder die Cyclodextrin Monotherapie ($2,195 \pm 0,260$ mm³, $p=0,932$) noch die Kombinationstherapie ($2,385 \pm 0,261$, $p = 0,582$) weisen einen statistisch signifikanten Unterscheid bei leicht erhöhtem DG-Volumen (Cyclodextrin-Monotherapie: +0,5%; Kombinationstherapie: +9,2%) auf. Auch die Miglustat-Monotherapie ($2,409 \pm 0,13$ mm³; $p=0,538$) zeigt bei einem gering erhöhten Volumen von 10,3% keinen signifikanten Unterschied zwischen den behandelten NPC1^{-/-} Versuchstieren und ihrer Kontrollgruppe. Auch die Therapieregime untereinander zeigen innerhalb der NPC1^{-/-} Gruppe keinen signifikanten Unterschied (Miglu/CD: $p= 0,578$; Kombi/CD: $p = 0,481$; Miglu/Kombi: $p = 0,987$). Alle therapierten gesunden NPC1^{+/+} Versuchsmäuse zeigen gegenüber den unbehandelten NPC1^{+/+}

Mäusen ein statistisch nicht signifikant ($p > 0,050$) verringertes Volumen (Cyclodextrin-Monotherapie: $2,320 \pm 0,23 \text{ mm}^3$; -11,7% ; Kombinationstherapie: $2,530 \pm 0,30 \text{ mm}^3$; -3,6%; Miglustat-Monotherapie: $2,209 \text{ mm}^3$; -15,9%). Auch die Therapien untereinander zeigen in der NPC1^{+/+} Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede untereinander (Kombi/CD: $p = 0,494$, Kombi/Miglu: $p=0,567$, CD/Miglu: $p = 0,683$) (*Abbildung 20, Tabelle 10*).

Tabelle 10: Vergleich der Volumina des Gyrus dentatus

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{-/-} Sham	- 16,9	< 0,001
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} CD only	+ 0,5	0,932
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Miglu only	+ 10,3	0,538
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 9,2	0,582
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} CD only	- 11,7	0,116
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Miglu only	- 15,9	0,465
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Kombi	- 3,6	0,692
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} Kombi	- 0,9	0,987
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} CD only	- 8,9	0,578
NPC1 ^{-/-} CD only	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 8,7	0,481
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 14,5	0,567
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} CD only	+ 5,0	0,683
NPC1 ^{+/+} CD only	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 9,1	0,494

Sham – Scheinbehandlung; CD only – Cyclodextrin Monotherapie, Miglu only – Miglustat – Monotherapie, Kombi – Kombinationsbehandlung

3.3.4 Sham-Gruppe zeigt signifikante Volumenunterschiede im Subiculum

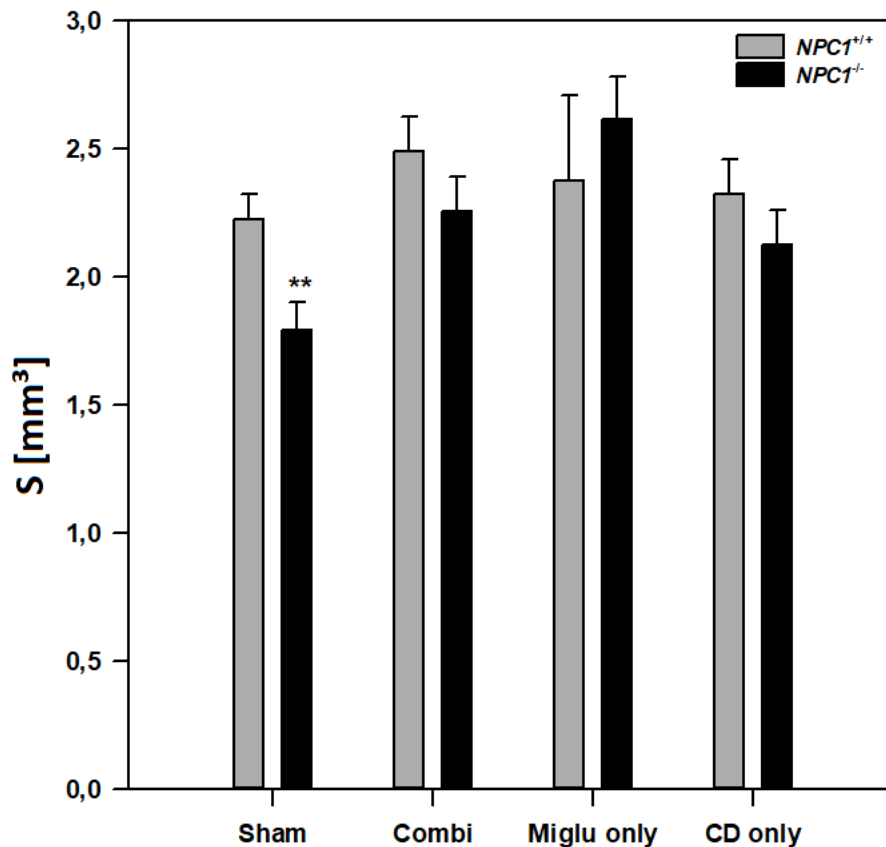


Abbildung 21: Volumetrische Unterschiede im Subiculum innerhalb der Versuchsgruppen

S – Subiculum, Gyrus dentatus, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe
Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,006$) bezüglich des Volumens der erkrankten Tiere ($1,790 \text{ mm}^3$) und der $NPC1^{+/+}$ Kontrollgruppe ($2,222 \text{ mm}^3$). Auch unter Kombi- und Cyclodextrintherapie zeigen sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, statistisch nicht signifikant verminderte Volumenabnahmen innerhalb der $NPC1^{-/-}$ Versuchsgruppe.

Scheinbehandelte erkrankte Tiere ($1,790 \pm 0,464 \text{ mm}^3$) lassen ein statistisch signifikant ($p = 0,006$) reduziertes Volumen von 19,4 % im Vergleich zu ihrer gesunden $NPC1^{+/+}$ Kontrollgruppe ($2,222 \pm 0,377 \text{ mm}^3$) beobachten. Sowohl die Cyclodextrin- als auch die Kombitherapie führen zu einer reduzierten Volumenabnahme im Vergleich zu ihrer untherapierten erkrankten Kontrollgruppe ($1,790 \pm 0,464 \text{ mm}^3$). Während Cyclodextrin eine Volumendifferenz von 18,7 % ($2,125 \pm 0,262 \text{ mm}^3$, $p = 0,178$) zeigt, lässt die Kombinationstherapie eine Messwertdifferenz von 25,8% ($2,491 \pm 0,325 \text{ mm}^3$, $p = 0,058$) beobachten. Auch die Miglustatmonotherapie zeigt, im Vergleich zur ihrer untherapierten Kontrollgruppe, einen statistisch signifikanten Volumenunterschied von 46,1% ($2,616 \pm 0,270 \text{ mm}^3$, $p = 0,001$). Innerhalb der $NPC1^{-/-}$ Versuchsgruppe lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Therapien beobachten (Miglu/Kombi: $p = 0,188$; Miglu/CD: $p = 0,107$; CD/Kombi: $p = 0,510$). Im Vergleich zu ihren unbehandelten $NPC1^{+/+}$ Kontrolltieren

($2,222 \pm 0,377 \text{ mm}^3$), zeigen therapierte gesunde Versuchstiere eine statistisch nicht signifikante Volumenzunahme im Subiculum (Cyclodextrin-Monotherapie: $2,322 \pm 0,239 \text{ mm}^3$; +4,5%; $p = 0,962$; Miglustat-Monotherapie: $2,377 \text{ mm}^3$; +7,0%; $p = 0,960$; Kombinationstherapie: $2,491 \pm 0,101 \text{ mm}^3$; +12,1% ; $p = 0,534$). Auch innerhalb der NPC1^{+/+} Versuchsgruppe lassen die Therapien keine signifikanten Unterschiede zueinander beobachten (Miglu/Kombi: $p = 0,556$; Miglu/CD: $p = 0,489$; CD/Kombi: $p = 0,484$) (**Abbildung 21, Tabelle 11**).

Tabelle 11: Vergleiche der Volumina im Subiculum

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{-/-} Sham	- 19,4	0,006
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} CD only	+ 18,7	0,178
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Miglu only	+ 46,1	0,001
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Kombi	+25,8	0,058
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} CD only	+ 4,5	0,962
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Miglu only	+ 7,0	0,960
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 12,1	0,534
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} Kombi	- 13,8	0,188
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} CD only	- 18,8	0,107
NPC1 ^{-/-} CD only	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 6,0	0,510
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 4,7	0,556
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} CD only	- 2,3	0,489
NPC1 ^{+/+} CD only	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 7,3	0,484

Sham – Scheinbehandlung; CD only – Cyclodextrin Monotherapie, Miglu only – Miglustat – Monotherapie, Kombi – Kombinationsbehandlung

3.3.5 Keine signifikanten volumetrischen Unterschiede im Prä- und Parasubiculum

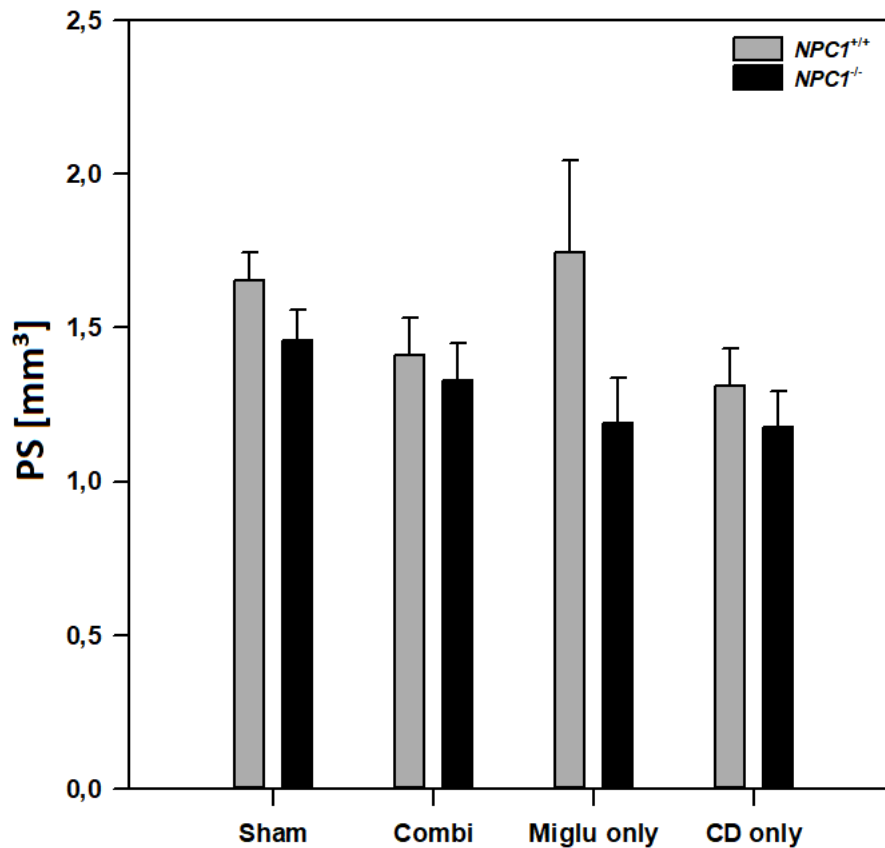


Abbildung 22: Volumenunterschiede des Prä- und Parasubiculums innerhalb der Gruppen

PS – Prä- und Parasubiculum, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe
Innerhalb der Gruppen sind statistisch nicht signifikante Volumenunterschiede zu beobachten.

Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter ($p = 0,148$) Volumenunterschied von 11,8% zwischen der NPC1^{-/-} ($1,469 \pm 0,256 \text{ mm}^3$) Versuchsgruppe und der gesunden Kontrollgruppe ($1,655 \pm 0,446 \text{ mm}^3$). Auch die therapierten NPC1^{-/-} Versuchstiere lassen im Vergleich zu ihren unbehandelten Kontrolltieren ($1,469 \pm 0,256 \text{ mm}^3$) reduzierte Volumina beobachten. Während unter Cyclodextrin ein vermindertes Volumen von 19,4% ($1,175 \pm 0,163 \text{ mm}^3$; $p = 0,378$) nachweisbar ist, zeigt die Miglustatherapie eine Volumenabnahme von 18,4% ($1,190 \pm 0,133$; $p = 0,525$). Auch die Kombinationstherapie lässt bei den kranken Versuchstieren eine Volumendifferenz von 8% ($1,330 \pm 0,221$; $p = 0,798$) gegenüber ihren unbehandelten Kontrolltieren beobachten. Die Therapien untereinander zeigen innerhalb der NPC1^{-/-} Versuchsgruppe keinen signifikanten Unterschied (Miglu/Kombi: $p = 0,717$; Miglu/CD: $p = 0,938$; CD only/Kombi: $p = 0,843$). Auch in der NPC1^{+/+} Versuchsgruppe ist im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ($1,655 \pm 0,446 \text{ mm}^3$) sowohl unter der Cyclodextrintherapie als auch unter der Kombinationstherapie ein nicht signifikant reduzierteres (p jeweils $> 0,050$) Volumen zu beobachten. Cyclodextrin zeigt eine Volumendifferenz von 20,7% ($1,312 \pm 0,221 \text{ mm}^3$) und die Kombinationstherapie einen

Messwertunterschied von 14,8% ($1,410 \pm 0,303 \text{ mm}^3$). Die Miglustattherapie führt zu einem nicht signifikant erhöhten Volumen von 5,5% ($1,747 \text{ mm}^3$; $p = 0,769$) im Vergleich zu unbehandelten gesunden Kontrolltieren. Die Therapieregime untereinander zeigen auch in der gesunden Versuchstiergruppe keine signifikanten Unterschiede zueinander (Miglu/Kombi: $p = 0,656$; Miglu/CD: $p = 0,552$; CD/Kombi: $p = 0,814$) (*Abbildung 22, Tabelle 12*).

Tabelle 12: Vergleiche der Volumina im Prä- und Parasubiculum

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	- 11,8	0,148
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	- 19,4	0,378
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	- 18,4	0,525
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	- 8,8	0,798
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	- 20,7	0,155
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	+ 5,5	0,769
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	- 14,8	0,445
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 11,8	0,717
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	- 1,3	0,938
<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 13,2	0,843
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	- 3,4	0,656
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	- 24,9	0,552
<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	+ 7,5	0,814

Sham – Scheinbehandlung; *CD only* – Cyclodextrin Monotherapie, *Miglu only* – Miglustat – Monotherapie, *Kombi* – Kombinationsbehandlung

3.3.6 Volumetrische Unterschiede in der Area entorhinalis

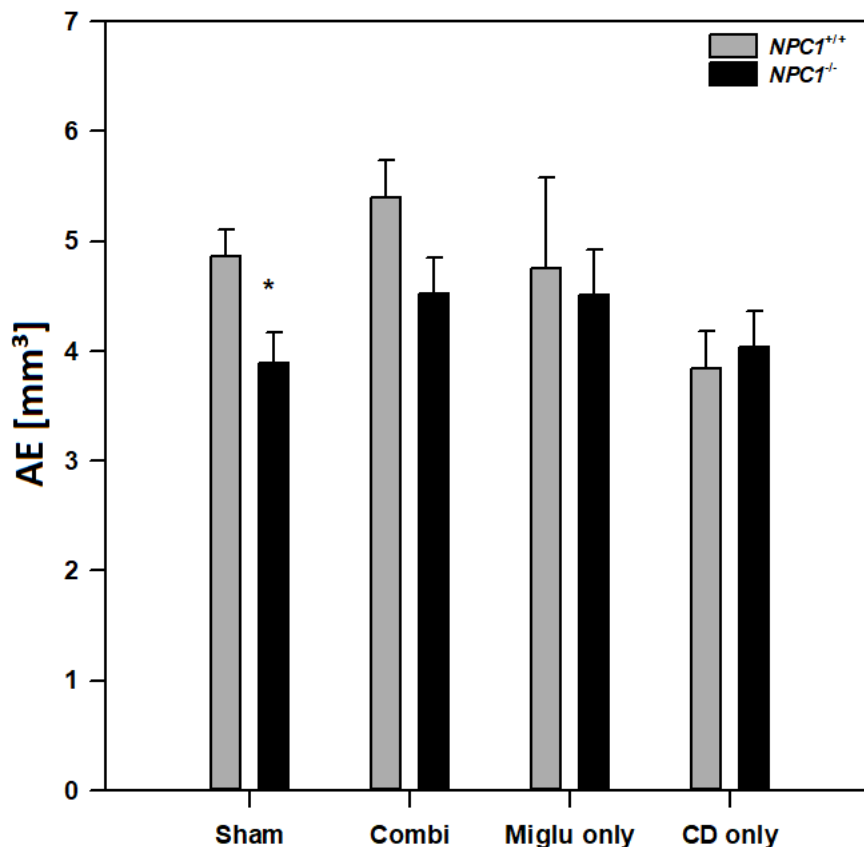


Abbildung 23: Volumenunterschiede der Area entorhinalis innerhalb der Gruppen

AE – Area entorhinalis, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe
Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der AE-Volumina der gesunden und erkrankten Versuchstiere ($p = 0,012$) mit Werten von $4,863 \text{ mm}^3$ innerhalb der NPC1^{+/+} Gruppe gegenüber $3,892 \text{ mm}^3$ in der NPC1^{-/-} Gruppe.

Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich ein statistisch signifikanter ($p = 0,012$) Volumenunterschied von 20,0% zwischen der NPC1^{-/-} - Versuchsgruppe ($3,892 \pm 0,660 \text{ mm}^3$) und der gesunden Kontrollgruppe ($4,863 \pm 1,180 \text{ mm}^3$). Innerhalb der NPC1^{-/-} Gruppe lassen sich auch unter Therapie Volumenunterschiede im Vergleich zu ihrer unbehandelten erkrankten Kontrollgruppe beobachten, die hingegen statistisch nicht signifikant sind (Cyclodextrin-Monotherapie: +3,6%; $4,031 \pm 0,660 \text{ mm}^3$; $p = 0,937$; Miglustat-Monotherapie: +16,0%; $4,515 \pm 0,520 \text{ mm}^3$; $p = 0,669$; Kombinationstherapie: +16,1%; $4,518 \pm 0,700 \text{ mm}^3$; $p = 0,637$). Auch die Therapieregime untereinander zeigen innerhalb der der NPC1^{-/-} - Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede zueinander (Miglu/Kombi: $p = 0,997$; Miglu/CD: $p = 0,745$; CD/Kombi: $p = 0,774$). Innerhalb der NPC1^{+/+} - Gruppe lässt die Cyclodextrintherapie einen statistisch nicht signifikanten ($p = 0,090$) Volumenunterschied von 20,9% zwischen der behandelten Gruppe ($3,844 \pm 0,830 \text{ mm}^3$) und der unbehandelten Kontrollgruppe ($4,863 \pm 1,18 \text{ mm}^3$) beobachten. Auch die Kombi- ($5,401 \pm 0,520$

mm³; +11,1%; p = 0,598) und die Miglustat-Therapie (3,844 mm³; -2,2%; p = 0,903) zeigen innerhalb der NPC1^{+/-}- Gruppe nicht signifikante Differenzen der Messwerte im Vergleich zu ihrer nicht behandelten Kontrollgruppe. Die Therapien untereinander lassen in der gesunden Versuchsgruppe nur beim Vergleich von Cyclodextrin- und der Kombinationstherapie einen signifikanten (p = 0,012) Volumenunterschied von 40,5% beobachten. Die anderen Therapien zeigen keine signifikanten Differenzen (p jeweils > 0,050) (**Abbildung 23, Tabelle 13**).

Tabelle 13: Vergleiche der Volumina der Area entorhinalis

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{-/-} Sham	- 20,0	0,012
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} CD only	+ 3,6	0,937
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Miglu only	+ 16,0	0,699
NPC1 ^{-/-} Sham	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 16,1	0,637
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} CD only	- 20,9	0,090
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Miglu only	- 2,2	0,903
NPC1 ^{+/+} Sham	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 11,1	0,598
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} Kombi	± 0,0	0,997
NPC1 ^{-/-} Miglu only	NPC1 ^{-/-} CD only	- 10,7	0,745
NPC1 ^{-/-} CD only	NPC1 ^{-/-} Kombi	+ 12,1	0,774
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 13,5	0,721
NPC1 ^{+/+} Miglu only	NPC1 ^{+/+} CD only	- 19,3	0,669
NPC1 ^{+/+} CD only	NPC1 ^{+/+} Kombi	+ 40,5	0,012

Sham – Scheinbehandlung; CD only – Cyclodextrin Monotherapie, Miglu only – Miglustat – Monotherapie, Kombi – Kombinationsbehandlung

3.3.7 Sham-Gruppe zeigt volumetrische Unterschiede im piriformen Kortex

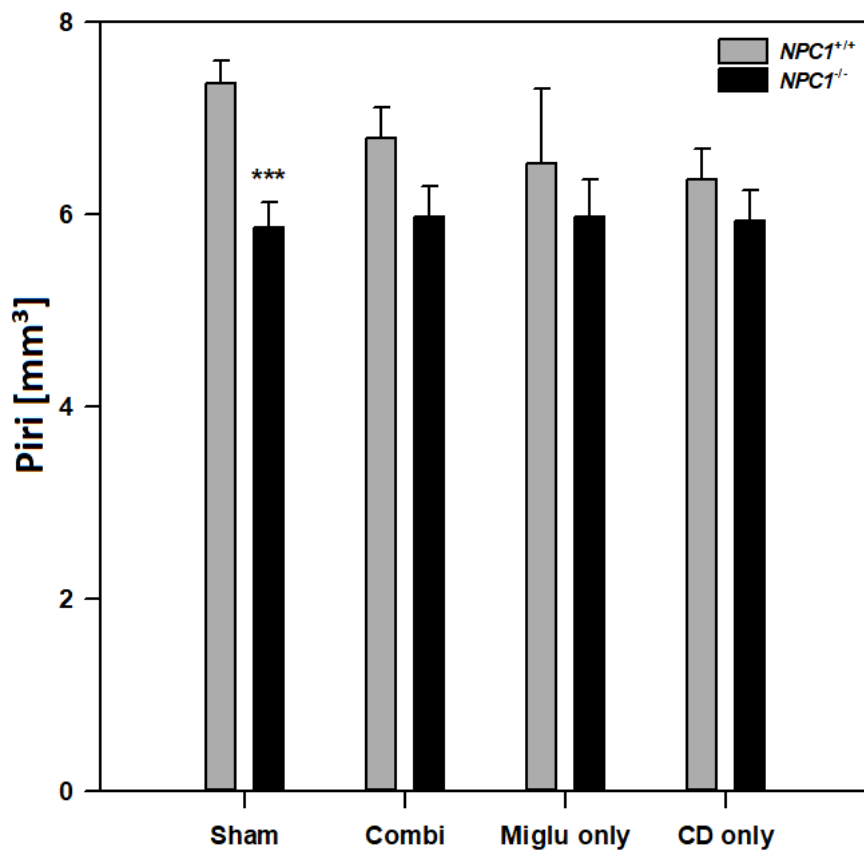


Abbildung 24: Volumenunterschiede des piriformen Kortex innerhalb der Gruppen

Piri – piriformer Kortex, Sham – scheinbehandelte Gruppe, Combi – kombinationsbehandelte Gruppe, Miglu only – Miglustat monotherapierte Gruppe, CD only – Cyclodextrin monotherapierte Gruppe
 Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied der Piri-Volumina der gesunden und erkrankten Versuchstiere ($p = 0,012$) mit Werten von $7,263 \text{ mm}^3$ innerhalb der NPC1^{+/+} Gruppe gegenüber $5,867 \text{ mm}^3$ in der NPC1^{-/-} Gruppe. Erkrankte therapierte NPC1^{-/-} Versuchstiere zeigen keinen signifikanten Unterschied zu ihren nicht behandelten Kontrolltieren.

Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich ein statistisch signifikanter ($p < 0,001$) Volumenunterschied von 20,3% zwischen der NPC1^{-/-} - Versuchsgruppe ($5,867 \pm 0,640 \text{ mm}^3$) und der gesunden Kontrollgruppe ($7,263 \pm 0,930 \text{ mm}^3$). Unter Therapie lassen sich innerhalb der NPC1^{-/-} - Versuchsgruppe nur geringe und nicht signifikante Volumenunterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe beobachten (Cyclodextrin-Monotherapie: +1,2%; $p = 1,000$; Miglustat-Monotherapie: +1,9%; $p = 1,000$; Kombinationstherapie: +1,9%; $p = 1,000$). Auch untereinander weisen die Therapien bei den NPC1^{-/-} Tieren keine signifikanten Unterschiede zueinander auf (Miglu/Kombi: $p = 0,998$; Miglu/CD: $p = 0,995$; CD/Kombi : $p = 1,000$). Innerhalb der NPC1^{+/+} Gruppe zeigt die Cyclodextrintherapie einen nicht signifikanten ($p = 0,093$) Volumenunterschied von 13,5% zwischen der behandelten ($6,369 \pm 0,780 \text{ mm}^3$) und der unbehandelten Gruppe ($7,263 \pm 0,930 \text{ mm}^3$). Auch die Miglustat- ($6,532 \text{ mm}^3$; -11,4%; $p = 0,772$)

und die Kombinationstherapie ($6,792 \pm 0,580 \text{ mm}^3$; -7,7%; $p = 0,576$) lassen bei den therapierten Tieren ein reduziertes Volumen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren ($7,263 \pm 0,930 \text{ mm}^3$) beobachten. Die Therapien zeigen bei den gesunden Tieren keine signifikanten Unterschiede zueinander (Miglu/Kombi: $p = 0,938$; Miglu/CD: $p = 0,856$; CD/Kombi: $p = 0,729$) (*Abbildung 24, Tabelle 14*).

Tabelle 14: Vergleiche der Volumina des piriformen Kortex

Gruppe 1 (100%)	Gruppe 2	Differenz (%)	Signifikanz (p)
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	- 20,3	< 0,001
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	+ 1,2	1,000
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	+ 1,9	1,000
<i>NPC1</i> ^{-/-} Sham	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 1,9	1,000
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	- 13,5	0,093
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	- 11,4	0,772
<i>NPC1</i> ^{+/+} Sham	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	-7,7	0,576
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	± 0	0,998
<i>NPC1</i> ^{-/-} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	- 0,7	0,995
<i>NPC1</i> ^{-/-} CD only	<i>NPC1</i> ^{-/-} Kombi	+ 0,8	1,000
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	+ 4,1	0,938
<i>NPC1</i> ^{+/+} Miglu only	<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	- 2,4	0,856
<i>NPC1</i> ^{+/+} CD only	<i>NPC1</i> ^{+/+} Kombi	+ 6,6	0,729

Sham – Scheinbehandlung; *CD only* – Cyclodextrin Monotherapie, *Miglu only* – Miglustat – Monotherapie, *Kombi* – Kombinationsbehandlung

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NPC1-Mutation das Volumen limbischer Areale im BALB/c Mausmodell wesentlich beeinflusst. Scheinbehandelte *NPC1*^{-/-} Versuchstiere zeigen signifikant kleinere Strukturen als die unbehandelten *NPC1*^{+/+} Mäuse. Im Durchschnitt ließen sich um 17,1 % verkleinerte Hirnareale bei erkrankten Versuchstieren im Vergleich zu ihren gesunden Kontrolltieren nachweisen. Statistisch signifikant reduzierte Volumina konnten in CA1, im Gyrus dentatus, im Bereich des Subiculums, innerhalb der Area entorhinalis und im piriformen Kortex beobachtet werden. Wobei CA1 und der piriforme Kortex besonders stark von der NPC1-Mutation betroffen zu sein scheinen und Volumendifferenzen zwischen 20,3% (PIRI) und 22,5% (CA1) aufweisen. Unter Therapie lässt sich in fast allen untersuchten Arealen eine statistisch nicht signifikante Abnahme des krankheitsbedingten Volumenverlusts beobachten. Dabei unterscheiden sich die Kombinations- und Miglustat-Therapie nicht wesentlich voneinander und zeigen im Schnitt Volumenzunahmen von 16,8% (Miglustat-Monotherapie) und 16,5% (Kombinationstherapie) im Vergleich zur unbehandelten erkrankten Kontrollgruppe. Die Cyclodextrin-Monotherapie reduzierte

den krankheitsbedingten Volumenverlust um lediglich 8,5%. Überraschenderweise zeigen gesunde therapierte NPC1^{+/+} Mäuse teilweise reduzierte Volumina in den untersuchten Hirnarealen. Bei Betrachtung des Körper- und Hirngewichts sind signifikante Interaktionen zwischen dem Genotyp und der Behandlungsgruppe zu beobachten. Sowohl das Körper- (Differenz von 45,6%) als auch das Hirngewicht (Differenz von 21,9%) erkrankter Versuchstiere sind bedeutend niedriger als das der gesunden Kontrollgruppe. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass scheinbehandelte NPC1^{-/-} Versuchstiere, ein im Verhältnis zum Körpergewicht größeres Gehirn besitzen als ihre Kontrolltiere. Unter allen drei Therapieregimen lässt sich bei den NPC1^{-/-} Versuchstieren eine reduzierte krankheitsbedingte Abnahme des Körper- und Hirngewichts nachweisen. Zu Beginn der Arbeit berechnete Schrumpfungsfaktoren zeigen sich normal verteilt und sind unabhängig von Genotyp, dem Geschlecht und der Behandlungsgruppe. Dies spricht für eine exzellente Qualität und Reproduzierbarkeit der histologischen Aufarbeitung.

4 Diskussion

Kognitive Beeinträchtigungen gehören zu den Kernsymptomen des adulten Morbus Niemann-Pick Typ C. Unter anderem wurden psychiatrische Symptome sowie Störungen des Gedächtnisses beschrieben (Sévin et al., 2007; Walterfang et al., 2006). Das limbische System und explizit der Hippocampus besitzen eine Schlüsselrolle bei der Bildung des deklarativen und episodischen Gedächtnisses (Walterfang et al., 2013), die eine Untersuchung auf etwaige NPC1 verursachte Destruktionen als potentielle Ursache für kognitive Beeinträchtigungen rechtfertigen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwiefern das limbische System durch eine Mutation des NPC1-Proteins morphologische Veränderungen erfährt und in welchen Maß sich diese durch unterschiedliche Therapieregime revidieren lassen. Dafür wird das Volumen des Hippocampus, der Area entorhinalis und des piriformen Kortex sowohl von scheintherapierten als auch von therapierten NPC1^{+/+} und NPC1^{-/-} Versuchsmäusen bestimmt. Eine Abnahme des krankheitsbedingten Volumenverlusts unter Therapie wird als protektiver Effekt des Wirkstoffs gewertet. Die Therapieeffekte der Kombi-, Miglustat- und HPβCD-Therapie werden untereinander verglichen und mit Referenzwerten gesunder scheintherapierter Kontrolltiere verglichen.

4.1 Beurteilung des Tiermodells

Vor Beginn einer jeden Studie am Tiermodell ist zu überlegen, welches Modell das menschliche System und die zu untersuchende Krankheit am besten widerspiegelt. In der aktuellen Forschung macht man sich die Analyse von Omics Expressionsdaten von Mensch und Tier zu Nutze, um ein geeignetes Modell für die Beantwortung diverser Fragestellungen identifizieren zu können (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2020). Aufgrund der niedrigen Prävalenz des Morbus Niemann-Pick Typ C ist eine direkte Forschung am Menschen und die Untersuchung humaner Gewebeproben stark limitiert (Grau et al., 2003). Als Konsequenz sind experimentelle Versuche am Tiermodell, für

die Ergründung der genauen Pathophysiologie und der Auswirkungen einer pharmakologischen Behandlung, essenziell. Da NPC1 unterschiedliche Krankheitsverläufe und ein umfassendes heterogenes Erscheinungsbild aufweist, ist stets zu beachten, dass nicht alle existierenden Tiermodelle uneingeschränkt auf das humane Krankheitsbild übertragbar sind (Patterson et al., 2013; Vanier, 2010). Das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell BALB/c besitzt das Niemann-Pick Typ C1 NIH Allel, welches sich bei Homozygotie ausprägt (Pentchev et al., 1980; The Jackson Laboratory 2020). Es handelt sich dabei um das in der NPC1-Forschung am häufigsten verwendete Tiermodell und wurde aufgrund seiner zahlreichen Aufführungen in der medizinischen Literatur auch in dieser Forschungsarbeit verwendet. Der klinische Verlauf entspricht am ehesten der frühen und rasant fortschreitenden Form des Morbus Niemann Pick Typ C. BALB/c eignet sich damit besonders gut zur Erforschung der infantilen Verlaufsform (Maue et al., 2012). Diese tritt allerdings viel seltener als die juvenile oder adulte Form auf, was zugleich einen der größten Kritikpunkte des verwendeten Mausmodells ausmacht. Der Phänotyp eines anderen etablierten Mausmodells, C57BL^{/6J} NPC1^{nmf164}, entspricht hingegen der deutlich häufigeren späten Form des Morbus Niemann Pick Typ C und ist damit ebenfalls von besonderer Bedeutung für die Forschung (Maue et al., 2012). Diverse Studien zeigen, dass die Maus auf molekularer Ebene sehr ähnlich wie der Mensch reagiert (Max Planck Gesellschaft, 2020). Inwieweit Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen übertragbar sind, wird kontrovers diskutiert und macht das sorgfältige Abwägen der Notwendigkeit einer Tiermodell-Studie umso wichtiger. Trotz der herausragenden Stellung der Maus als Forschungsinstrument, sollten Tierversuche im Allgemeinen auf ein unerlässliches Maß gesenkt werden und den Tieren stets eine bestmögliche Haltung gewährt werden (Bundesinstitut für Risikobewertung, 2020).

4.2 Kritische Beurteilung der Pharmakotherapie

Bedauerlicherweise konnte bislang kein kurativer Therapieansatz der Stoffwechselerkrankung Morbus Niemann Pick Typ C1 beschrieben werden. Im Vordergrund der gängigen Behandlungsregime stehen sowohl die Symptomkontrolle als auch der Erhalt von Lebensqualität und der aktiven Teilhabe am Gesellschaftsleben. In dieser Arbeit erfolgte neben der zahlreich bewährten SRT/BPT-Kombinationstherapie (Substrate-Reduction-Therapy/By-Product-Replacement-Therapy) die differenzierte Applikation der Medikamente Miglustat und HP β CD an NPC1-Mutanten und ihren Kontrolltieren, um deren individuelle Wirkweise darzustellen und die Therapieregime untereinander zu vergleichen (Maass et al., 2015; Neßlauer et al., 2019; Patterson et al., 2013). Die NPC1-Forschungsgruppe der Universitätsmedizin Rostock konnte bisher anhand des Mausmodells ein therapeutischen Nutzen der Kombinationstherapie im Hinblick auf corneale Lipidablagerungen, cerebelläre neurodegenerative Prozesse und der Proliferationsaktivität olfaktorischer Epithelien nachweisen, sodass auch die Untersuchung limbischer Areale unter Therapie naheliegend war (Hovakimyan et al., 2013a/b; Hovakimyan et al., 2011; Maass et al., 2015; Meyer et al., 2017; Witt et al., 2018). Miglustat ist seit 2009 das einzige Medikament, welches für die palliative Behandlung des

Morbus Niemann Pick Typ C1 zugelassen ist (European Medicine Agency, 2020). Neben zahlreicher Ergebnisse aus Tierversuchsreihen, die einen krankheitsmodifizierenden Benefit beobachten lassen, konnte Miglustat durch seinen vermehrten Einsatz und die wachsende klinische Erfahrung, seine Wirksamkeit unter Beweis stellen (Pineda et al., 2018; Pineda et al., 2019; Sedel et al., 2016). Um klinisch relevante Daten hervorbringen zu können, ist Miglustat auch in dieser Studie ein obligater Bestandteil des Therapieregimes und wurde als Monotherapie oder in Kombination verabreicht. Allopregnanolon hingegen scheint ein in der NPC1-Therapie unterschätztes Therapeutikum darzustellen. Präklinische Studien zeigen, dass es als Proliferationsfaktor neuronaler Stammzellen fungiert und damit für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen geeignet ist. Der protektive Effekt des Neurosteroids wird in zahlreichen Forschungsarbeiten erwähnt und rechtfertigt die Applikation von Allopregnanolon im Rahmen der Kombinationstherapie auch in dieser Arbeit (Hernandez & Brinton, 2019; Karout et al., 2016). Der Wirkstoff 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) wurde sowohl in Kombination als auch als Monotherapie verabreicht. Er diente bereits in diversen Studien als Trägerstoff von Allopregnanolon und zeigte dabei einen eigenen signifikanten Benefit auf den Krankheitsverlauf des Morbus Niemann-Pick (Davidson et al., 2009; Griffin et al., 2004). Während einer offenen Phase-1-2a-Studie (September 2013 - Januar 2015) im National Institutes of Health (NIH, Bethesda, MD, USA) konnte, bei akzeptablen Sicherheitsprofil, eine verlangsamte Krankheitsprogression beobachtet werden und unterstützte damit die Einleitung weiterer kontrollierter, randomisierter und multinationaler Studien (Ory et al., 2017). Der Gebrauch von HP β CD wird, trotz vielversprechender Ergebnisse, durch die intrathekale Applikation und der notwendigen hohen Dosen begrenzt (Kulkarni et al., 2018). Die Wichtigkeit einer zusätzlichen Studie zum Cyclodextrin-basierten Prodrug (ORX-301), welches in der Lage ist, die therapeutischen Einschränkungen zu überwinden, wird umso deutlicher (Kulkarni et al., 2018). ORX-301 wirkt bei verringerten Dosen effizienter als HP β CD und kann darüber hinaus die Blut-Hirn-Schranke passieren. Gegenwärtig wird HP β CD in einer multinationalen klinischen Phase-2b-3-Studie getestet. Ergebnisse sind bisher nicht veröffentlicht (National Center of Advancing Translational Sciences, National Institutes of Health, 2020). Im folgenden Diskussionsteil werden alle erhobenen Daten mit denen der scheinbehandelten NPC1^{+/+} Versuchsgruppe verglichen, um die Ergebnisse einheitlich darstellen zu können.

4.3 Gewichtsunterschiede innerhalb der Gruppen

Das Körpergewicht der scheinbehandelten NPC1^{-/-} Versuchstiere zeigt sich gegenüber der unbehandelten gesunden NPC1^{+/+} Mäuse um 45,6 % reduziert. Unter Kombinationstherapie waren die Messwerte der NPC1^{-/-} Versuchstiere im Vergleich zu ihren scheinbehandelten erkrankten Kontrolltieren um 40,6% erhöht. Damit erreichten sie 76,5% des Referenzgewichts (RG) der gesunden Vergleichsgruppe. Auch die HP β CD- (+52,1%; 82,8% vom RG) und die Miglustat-monotherapierten (+62,8%; 88,6% vom RG) NPC1^{-/-} Versuchstiere zeigten im Vergleich zu

ihren scheintherapierten Kontrollgruppen eine Zunahme des Körpergewichts (**Abbildung 15**). Diverse Forschungsarbeiten bestätigen, dass der krankheitsbedingte Gewichtsverlust ein signifikanter Indikator für die Progression des Morbus Niemann Pick Typ C sei (Ahmad et al., 2005; Morris, 1982; Vöikar et al., 2002). Als mögliche Ursache für den fortschreitenden Gewichtsverlust werden cerebelläre Einschränkungen, die sich in Form von Ataxien und motorischen Einbußen präsentieren, diskutiert. Eine Dysphagie kann bei ungefähr 80% der NPC-Patienten nachgewiesen werden und stellt damit einen der größten Risikofaktoren für eine motorisch beeinflusste Nahrungsaufnahme dar (Garver, Francis, et al., 2007; Patterson et al., 2013; Walterfang et al., 2012). Neben der verschlechterten neuromuskulären Koordination wird außerdem ein NPC1-Protein-Verlust im enteralen Nervensystem diskutiert. Lipidspeicherungen in gastrointestinalen Neuronen sind ein häufiges Phänomen bei NPC-Patienten und können ursächlich für eine enterale Dysfunktion sein (Gilbert et al., 1981; Kapur et al., 2009). Auch die beim NPC häufig beschriebenen Leberfunktionsstörungen durch Lipidakkumulationen und resultierende Beeinflussungen des Cholesterolaushalts werden als mögliche Ursache des krankheitsbedingten Gewichtsverlust diskutiert (Beltroy et al., 2005; Li et al., 2005). In dieser Arbeit konnte sowohl unter Kombinations- als auch unter beiden Monotherapien eine verminderte Gewichtsabnahme beobachtet werden. HPßCD wirkt dabei vermutlich über eine Unterdrückung von SREBP2 Zielgenen, was letztlich eine verminderte Cholesterin Synthese bedingt. Überschüssiges Cholesterin wird dabei in den metabolisch aktiven Pool umlagert und schließlich über die Gallensäure ausgeschieden, sodass pathologische Lipidablagerungen reduziert werden (Liu et al., 2010). Der Wirkstoff Miglustat verhindert als reversibler Inhibitor der Glucosylceramid-Synthase (GCS) ebenfalls das Voranschreiten der krankheitsdefinierenden Lipidakkumulation (Plattm et al., 1994) und hat gleichzeitig einen positiven Einfluss auf die Calcium Homöostase (Lloyd-Evans et al., 2003, 2008; Lloyd-Evans & Platt, 2011). Sowohl die Kombinationsbehandlung als auch beide Monotherapien zeigen ähnliche Ergebnisse. Die NPC1^{-/-} Miglustat-monotherapierte Gruppe weist in dieser Arbeit die größte Körpergewichtsdifferenz im Vergleich zu den unbehandelten erkrankten Mäusen auf. Wie genau die einzelnen Behandlungsregime und ihre Wirkmechanismen der Gewichtsabnahme entgegenwirken und auf welches Medikament der Therapieeffekt innerhalb der Kombinationstherapie zurückzuführen ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die genaue Genese der Gewichtsabnahme zu verstehen und Therapietargets optimal ausrichten zu können.

4.4 Unterschiede des Hirngewichts

In dieser Arbeit zeigten die NPC1^{-/-}-Tiere kleinere Gehirne als ihre gesunden Kontrolltiere. Bei Berücksichtigung des Körpergewichts stellte sich heraus, dass die scheinbehandelten NPC1^{-/-}-Versuchsmäuse ein im Verhältnis zum Körpergewicht größeres Gehirn (*Quotient: Hirngewicht/Körpergewicht*) aufweisen (**Abbildung 17, Tabelle 7**). Es ist also anzunehmen, dass die NPC1-Mutation das Körpergewicht stärker beeinflusst als das Hirngewicht. Das

Hirngewicht ließ ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen und in jeder Behandlungsgruppe beobachten (**Abbildung 16**). Dabei weisen die erkrankten unbehandelten Tiere 21,1% niedrigere Messwerte als ihre gesunden Kontrolltiere auf. Die Cyclodextrin-monotherapierte NPC1^{-/-} Versuchsgruppe erreichte 86,7% des Referenzgewichts der gesunden Kontrollgruppe. Damit scheint die Cyclodextrin-Therapie im Hinblick auf die Hirngewichtsabnahme wirkungsvoller als die Kombinationstherapie (84,0% vom RG) und die Miglustat-Monotherapie (86,1% vom RG) zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren mit anderen Studiendaten zur Reduktion des Hirngewichts unter Morbus Niemann Pick Typ C. Diese zeigen teilweise Messwertdifferenzen von über 30% zwischen den NPC1^{-/-} - und NPC1^{+/+} - Hirnen im Mausmod (Beltroy et al., 2005; Maass et al., 2015; Tanaka et al., 1988). Darüber hinaus wurden signifikante Volumenreduktionen der Kleinhirnhemisphären und anderer Hirnareale wie der Medulla oblongata beschrieben, die den Gewichtsunterschied erklären könnten (German et al., 2001; Luan et al., 2008). Als weitere mögliche Ursache werden die fortschreitende Destruktion neuronalen Gewebes und die damit einher gehenden atrophischen Veränderungen diskutiert. Typische intrazelluläre Gangliosidspeicherungen sind hauptsächlich in den großen Pyramidenzellen, in Neuronen des Thalamus sowie des Hippocampus und in den Purkinjezellen des Cerebellums zu finden (German et al., 2001; Zervas, Dobrenis, et al., 2001). Diese Hirnregionen zeigen besonders schwere Degenerationserscheinungen und Atrophiezonen, die sich teilweise mithilfe von MRT-Verfahren darstellen lassen und für den beobachteten Gewichtsverlust verantwortlich sein könnten (Kohlschütter, 2015). Mit Voranschreiten der Erkrankung degenerieren nahezu sämtliche Purkinjezellen und auch im Hirnstamm ist ein Verlust dopaminerger Neurone zu beobachten (Luan et al., 2008). Des Weiteren werden degenerativ veränderte Myelinscheiden im NPC1^{-/-} Tiermodell beschrieben, die ebenfalls ursächlich für zentrale Substanzverluste und Messwertdifferenzen sein könnten (Lope-Piedrafita et al., 2008). Inwiefern die genannten neurodegenerativen Prozesse an der Reduktion des Hirngewichts beteiligt sind, lässt sich nicht eindeutig sagen und muss in weiteren Studien erforscht werden.

4.5 Volumenbestimmung limbischer Areale

Morbus Niemann-Pick bedingte neuropathologische Veränderungen des limbischen Systems sind weitestgehend unerforscht. In der Literatur sind einige wenige NPC1-Studien zu finden, die sich mit den morphologischen Veränderungen betrachteter Hirnareale unter Therapie oder Placebo beschäftigen. Im Folgenden wird daher vor allem Bezug zu den Forschungsarbeiten der Gruppe um Ong et al. (2001) und Walterfang et al. (2013) genommen und mit Ergebnissen dieser Arbeit verglichen. Aufgrund der Sonderstellung des limbischen Systems und der Wichtigkeit seiner uneingeschränkten Funktion, liegt der Fokus dieser Studie auf der Darstellung potentieller Einflüsse der NPC1-Mutation auf das Volumen des Hippocampus, der Area entorhinalis und des piriformen Kortex. Bisherige Daten zum NPC1 weisen in der Regel eine progressive Degeneration neuronalen Gewebes erkrankter Patienten und Tiere nach. Häufig wird vor allem das Kleinhirn mit seinem immensen neuronalen Zellverlust und etlichen Atrophiezonen als besonders stark betroffen

beschrieben (German et al., 2001; Tanaka et al., 1988). Im Laufe der NPC1-Erkrankung ist nahezu das gesamte Gehirn von den Degenerationserscheinungen betroffen. Das genaue Ausmaß der Destruktion und inwiefern das limbische System und der Hippocampus mit seinen Subregionen betroffen sind, konnte bis heute nicht vollständig erfasst werden.

4.5.1 Cornu Ammonis Region 1

Es ist aus der Literatur bekannt, dass sich im NPC1-Mausmodell degenerative Veränderungen im limbischen System mit gestörter Langzeitpotenzierung und Reduktion der Neuronen- und Synapsenzahl finden lassen (Byun et al., 2011; Zhou et al., 2011). Die Hippocampus-Subregion Cornu Ammonis Region 1 (CA1) stellt über den Alveus und die Fimbrien die Haupt-Outputstelle des Hippocampus dar und erhält ihre Afferenzen hauptsächlich über die Schaffer'schen Kollateralen und reziproke Projektionen vom Subiculum (Barnes et al., 2000; Duvernoy, 2005). Wenn man die individuelle Empfindlichkeit der unterschiedlichen Felder des Cornu Ammonis betrachtet, zeigt sich, dass CA1 als „vulnerabler—Sektor dem „resistenten—Sektor CA3 gegenübergestellt wird (Duvernoy, 2005). So wurde auch in der Forschungsarbeit der Gruppe um Ong et al (2001) gezeigt, dass die Region CA1 erkrankter NPC1^{-/-} Versuchstiere (BALB/c-Mausmodell) eine dichte Degeneration terminaler Pyramidenzellen aufweist, während CA3 von morphologischen Veränderungen ausgenommen bleibt (Ong et al., 2001). Auch Studien zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer weisen einen auf CA1 und dem Subiculum begrenzten Zelluntergang nach. CA3 blieb stets unbetroffen (Šimić et al., 1997; West, 1993). Vertex Analysen der NPC1-Studie um Walterfang et al. (2013) weisen darüber hinaus eine signifikante Volumenreduktion der CA1-Subregion des Hippocampus nach. Forschungsergebnisse wie diese und die der Gruppe um Ong et al. (2001) korrelieren mit Daten der vorliegenden Arbeit, die bei erkrankten Mäusen einen signifikanten Volumenverlust in CA1, aber nicht in CA3, beobachten lassen. Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigte sich bei den NPC1^{-/-} Versuchstieren ein signifikant kleineres CA1-Volumen von 22,5% im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Unter Kombinationstherapie liegt das Volumen erkrankter Tiere bei 99,6% des CA1-Referenzvolumens (RV) der gesunden Kontrolltiere. Das Volumen unter Miglustat-Monotherapie liegt bei 99,4% und das der Cyclodextrin-therapierten Mäuse bei 90,3% des RVs. Damit zeigt die HPβCD-Monotherapie einen kleineren protektiven Effekt als die Kombinations- und Miglustattherapie (**Abbildung 18, Tabelle 8**). Bislang existieren kaum Fremdarbeiten, die Volumenveränderungen des limbischen Systems unter Therapie betrachten. Die NPC1-Forschungsgruppe der Universitätsmedizin Rostock hat in den vergangenen Jahren Studien zur Steigerung der Proliferationsaktivität des Riechepithels unter Mono- und Kombinationstherapie durchgeführt, die nachweisen, dass sowohl die Kombinations- als auch die HPβCD-Monotherapie dem krankheitsbedingten Neuronenverlust olfaktorischer Hirnareale entgegenwirken (Meyer et al., 2017; Witt et al., 2018). Aufgrund der zahlreichen Verschaltungen des Bulbus Olfactoris zur Area prepiriformis und dem Hippocampus, der Geruchseindrücke mit Emotionen verknüpft, liegt es nahe, Parallelen zwischen dem Therapieeffekt auf olfaktorische Areale und limbischen Hirnregionen zu

ziehen. Auch die Gruppe um D’Arcangel et al. (2016) berichtet, dass Miglustat die krankheitsbedingte Beeinträchtigung synaptischer Plastizität der Region CA1 verbessern kann. Häufig wird ein kausaler Zusammenhang zwischen neuronalem Zellverlust, Hirnatrophien und damit verbundenen Volumenreduktionen diskutiert (Zeiler & Auff, 2007). Die bereits beschriebene Destruktion terminaler Pyramidenzellen in CA1 und damit verbundene insuffiziente Synapsenbildung könnten durchaus für die beobachtete Volumenreduktion in Frage kommen (Ong et al., 2001; Zeiler & Auff, 2007). Auch eine allgemein höhere Anfälligkeit von CA1 und seiner mehrfachen Verschaltung über die Schaffer’schen Kollateralen, dem Subiculum, Alveus und der Fimbrien könnten beim Ausbleiben der physiologischen Afferenzen zu einem reduzierten Volumen beitragen (Duvernoy, 2005). Während neokortikale Neuronenverluste mit Störungen der Hirnleistung korrelieren, werden Neuronenverluste im limbischen System besonders mit psychischen Funktions- und Gedächtnisstörungen assoziiert. Aufgrund der CA1 zugeschriebenen Aufgaben im Netz des Hippocampus, wie beispielsweise dem Abruf autobiographischen Wissens (Bartsch et al., 2011) oder der wesentlichen Rolle bei der räumlichen Orientierung (Suthana et al., 2009), könnte der Volumenverlust durchaus Ursache für die häufig beobachteten kognitiven Einschränkungen bei NPC1-Patienten oder der Veschlechterung des räumlichen Lernens im NPC1-Mausmodell sein (D’Arcangelo et al., 2016; Hovakimyan et al., 2013a; Zeiler & Auff, 2007). Die NPC1-Gruppe der Universitätsmedizin Rostock prüfte mithilfe des Morris-Water-Maze-Tests den Einfluss der SRT/BRT Kombinationstherapie auf das räumliche Lernen und Gedächtnis erkrankter NPC1^{-/-} Tiere. Dabei konnte ein statistisch signifikanter Benefit unter Therapie widerlegt werden (Hovakimyan et al., 2013a; Maaß, 2014). Warum sich in dieser Arbeit sowohl unter Kombinationsbehandlung als auch unter beiden Monotherapien ein reduzierter krankheitsbedingter Volumenverlust in CA1 darstellt, die Verbesserung der räumlichen Lernprozesse aber ausbleibt, ist weiterhin unklar und macht zusätzliche Forschungsarbeiten notwendig.

4.5.2 Cornu Ammonis Region 3

Die Subregion CA3 besitzt ebenso wie CA1 eine wichtige Rolle beim Codieren neuer räumlicher Informationen und erhält seine Afferenzen hauptsächlich vom Gyrus dentatus (Stupien et al., 2003). Gleichzeitig sendet CA3 reziproke Projektionen zurück und scheint an der Regulierung der Neurogenese im DG beteiligt zu sein (Liu et al., 2011). Wie bereits unter 4.5.1. beschrieben, zeigten sich in CA3 weder in den scheinbehandelten noch in den Behandlungsgruppen signifikante Volumenunterschiede. Diese Ergebnisse korrelieren mit Daten anderer Studien, die CA3 als „resistenten— Sektor beschreiben und auch im NPC1-Tiermodell keine morphologischen Veränderungen beobachten konnten (Duvernoy, 2005; Ong et al., 2001). Ursache für das Fehlen signifikanter volumetrischer Veränderungen innerhalb der Region CA3 könnte ihr autoassoziatives Netzwerk sein (Gilbert & Brushfield, 2009; Ishizuka et al., 1990). Die CA3-Neurone sind sowohl untereinander als auch über rückläufige Kollateralverbindungen miteinander verbunden. Möglicherweise gelingt es CA3 über dieses Netzwerk, trotz etwaiger Degenerationsprozesse, eine funktionierende Verschaltung und Synapsentätigkeit zu gewährleisten.

Damit könnte die Kommunikation zwischen den ortsständigen Pyramidenzellen aufrechterhalten und ein Substanzverlust aufgrund fehlender Afferenzen verhindert werden. Während das CA3-Volumen unter HPβCD-Monotherapie das Referenzvolumen (RV) der gesunden scheintherapierten Kontrollgruppe um 0,8% überschritt, sind es unter Kombinationstherapie sogar 7,2%. Auch unter Miglustat-Therapie ließen die behandelten NPC1^{-/-} Mäuse ein 4,6% größeres Volumen als das der scheinbehandelten NPC1^{+/+} Gruppe beobachten. Innerhalb der scheintherapierten Gruppe erbrachte die CA3-Volumenbestimmung um 8,6% reduzierte Messwerte bei den erkrankten Mäusen im Vergleich zu ihren gesunden Kontrolltieren (**Abbildung 19, Tabelle 9**). Es kommt also trotz der in der Literatur beschriebenen resistenten Stellung von CA3 zu einer geringfügigen Volumenabnahme, die sich unter allen drei Therapieregimen abschwächen und das Volumen der gesunden NPC1^{+/+} Tiere sogar überschreiten lässt. Die Region 3 des Cornu Ammonis scheint damit eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung NPC1-mutationsbedingter Symptome einzunehmen. Warum das Cornu Ammonis innerhalb seiner Subregionen so unterschiedlich auf die NPC1-Mutation reagiert und sich CA1 anfälliger als CA3 zeigt, sollte innerhalb weiterer Studien geklärt werden.

4.5.3 Gyrus dentatus

Der Gyrus dentatus erhält über den Tractus perforans als erste Instanz der Hippocampusformation Afferenzen des entorhinalen Kortex. Er ist wesentlich an der Bildung des episodischen Gedächtnisses beteiligt und nach aktuellem Stand der Wissenschaft, der einzige Ort im adulten Gehirn, der zur Neurogenese fähig ist (Anacker & Hen, 2017; Sahay et al., 2007). Zum aktuellen Zeitpunkt scheint es keine vergleichbare Forschungsarbeit zur Analyse des Gyrus dentatus im NPC1-Modell zu geben. Anhand der gesammelten Daten kann ein signifikanter Einfluss der NPC1-Mutation auf das Volumen des Gyrus dentatus angenommen werden. Die Ergebnisse der Volumenbestimmung zeigen innerhalb der scheintherapierten Gruppe ein signifikant unter den Werten gesunder Mäuse liegendes Messergebnis von 16,9% bei den erkrankten Tieren. Unter Kombinationstherapie erreichen die NPC1^{-/-} Mäuse 90,7% des RVs. Die Miglustat-behandelten Versuchstiere zeigen ein DG-Volumen, welches mit 91,7% dem RV der gesunden unbehandelten Kontrolltiere ziemlich nahe kommt. Unter HPβCD Therapie wurden lediglich 83,5% des RVs erreicht (**Abbildung 20, Tabelle 10**). Damit zeigt die Cyclodextrin-Monotherapie auch in diesem Subareal des Hippocampus den kleinsten protektiven Effekt auf den krankheitsdefinierenden Volumenverlust. Eine mögliche Ursache für das Therapieversagen unter HPβCD könnte ein lokalisationsabhängiger Effekt des Wirkstoffes sein, der sich unterschiedlich innerhalb des neuronalen Systems präsentiert. Denkbar wäre auch, dass die potentielle Wirkung von HPβCD durch seine dürftigen physikochemischen Eigenschaften und seiner eingeschränkten Überwindung der Blut-Hirn-Schranke limitiert wurde (Kulkarni et al., 2018). Anstelle der in dieser Arbeit durchgeführten intraperitonealen HPβCD-Applikation, könnten alternativ intrathekale Injektionen vollzogen werden, um mögliche pharmakokinetische Hindernisse zu umgehen. Warum die HPβCD-Therapie in diesem Areal und in CA1/CA3 weniger wirksam ist, als in

anderen Studien beschrieben, kann nicht abschließend geklärt werden und muss in weiteren Forschungsarbeiten untersucht werden.

4.5.4 Subiculum

Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigt sich bei den NPC1^{-/-} Versuchstieren ein signifikant kleineres Volumen von 19,4% im Vergleich zu ihrer gesunden Kontrollgruppe. Bislang scheint es keine Forschungsarbeit zu geben, die den Therapieeffekt der Kombinations- beziehungsweise der betrachteten Monotherapien auf NPC1 bedingte morphologischen Veränderungen des Subiculus überprüft. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Miglustat monotherapierte NPC1^{-/-} Versuchstiere das Referenzvolumen gesunder Kontrolltiere um 17,7% überschreiten. Während unter Kombinationstherapie das Subiculumvolumen 1,4% über dem Volumen der scheinbehandelten NPC1^{+/+} Mäuse liegt, erreicht die HPβCD-monotherapierte Gruppe lediglich 95,6% des RVs (*Abbildung 21, Tabelle 11*). Damit zeigt die HPβCD-Monotherapie auch im Bereich des Subiculus den geringsten protektiven Effekt auf den krankheitsbedingten Volumenverlust. Ergebnisse der scheintherapierten Gruppe korrelieren mit Daten der Gruppe um Walterfang et. al (2013), die ebenfalls einen NPC1-Mutations bedingten Volumenverlust im Subiculum nachgewiesen haben. Als mögliche Ursache dafür kommt das mutationsbedingte Auftreten von neurofibrillären Bündeln (NFB) im Bereich des Subiculus in Frage, was unter anderem bei post-mortem untersuchten NPC1-Patienten beobachtet werden konnte (Love et al., 1995; Kipuko Suzuki et al., 1995). In der Literatur werden diese vor allem im Zuge von Alzheimer-Studien mit Volumen- und Neuronenverlusten im Hippocampus assoziiert, was einen durch NFBs bedingten Substanzverlust im Bereich des Subiculus plausibel erscheinen lässt (Bobinski et al., 1996). NFBs und damit einhergehende Destruktionen werden häufig mit der Pathogenese des für Alzheimer typischen Gedächtnisverlustes in Verbindung gebracht. Damit stehen sie auch im Verdacht den bei NPC1 erkrankten Patienten und Tieren beobachteten kognitiven Abbau zu verursachen (Ashe, 2001; Bobinski et al., 1996). Das Subiculum stellt die Verbindungsstruktur zwischen Hippocampus und dem Gyrus parahippocampalis dar. Man nimmt an, dass eine funktionelle Trennung zwischen dem ventralen und dorsalen Abschnitt des Subiculus besteht. Während der ventrale Part mit der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse in Verbindung zu stehen scheint, ist der dorsale Part an der Prozessierung von räumlichen Einflüssen beteiligt (Cooper et al., 2006; Mueller et al., 2004; O'Mara, 2006). In dieser Arbeit wurde das Subiculum während der stereologischen Quantifizierung vollständig und ohne Unterteilung betrachtet. Auf welchen Abschnitt die beobachteten volumetrischen Unterschiede zutreffen und warum die HPβCD-Behandlung den geringsten Therapieeffekt aufweist, lässt sich nicht sicher sagen und sollte in weiteren Forschungsarbeiten geklärt werden.

4.5.5 Präsubiculum und Parasubiculum

Sowohl Prä- als auch Parasubiculum (PS) scheinen an der Verarbeitung räumlicher Eindrücke mithilfe ihrer „grid— und „place— Zellen beteiligt zu sein. Beide Areale werden häufig dem dorsalen Part

des Subiculum zugeordnet (Boccaro et al., 2010; Tang et al., 2016). Die Ergebnisse der Volumenvermessung des Prä- und Parasubiculum ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen oder innerhalb der Behandlungsgruppen. Die scheintherapierten NPC1^{-/-} Versuchstiere zeigen ein um 11,8% reduziertes Volumen gegenüber ihren gesunden Kontrolltieren. Unter Kombinationstherapie erreichen die erkrankten Tiere 80,4% des Referenzvolumens ihrer gesunden Kontrollgruppe. Ähnliche Werte lassen sich auch unter Miglustat- (71,9% des RVs) und unter HPβCD-Monotherapie (71,0% des RVs) beobachten (**Abbildung 22, Tabelle 12**). Therapierte NPC1^{-/-} Mäuse zeigen damit ein geringeres PS-Volumen als das der scheintherapierten erkrankten NPC1^{-/-} Versuchstiere. Es ist also anzunehmen, dass die Therapieregime im Hinblick auf den Bereich des Prä- und Parasubiculum keinen protektiven Effekt aufweisen und den krankheitsbedingten Volumenverlust sogar aggravieren. Warum sich hier im Gegensatz zu den anderen betrachteten Hirnregionen ein durch die Therapie verkleinertes Volumen beobachten lässt, ist fragwürdig und muss in weiteren Studien untersucht werden. Als mögliche Ursachen für die intensivierte PS-Volumenreduktion unter Therapie, lassen sich sowohl das heterogene Therapieansprechen der betrachteten Hirnareale als auch zahlreiche Nebenwirkungen der verwendeten Therapeutika nennen. Sowohl Miglustat als auch HPβCD scheinen über eine Veränderung neuronaler Lipidzusammensetzungen die Myelinisierung zu beeinträchtigen und könnten damit ursächlich für den beobachteten Volumenverlust sein (Schlegel et al., 2016). Mögliche Nebenwirkung kamen wahrscheinlich besonders im Bereich des Prä- und Parasubiculum zum Tragen und relativierten dort den positiven Benefit eingesetzter Wirkstoffe.

4.5.6 Area enthorinalis

Die Area entorhinalis (AE) stellt die Verbindung zwischen Hippocampus und Neokortex dar. Sie sendet zahlreiche Efferenzen an alle Subfelder des Hippocampus (Kerr et al., 2007; Van Cauter et al., 2013) und ist sowohl an der Prozessierung räumlicher als auch propriozeptiver Informationen beteiligt (Hafting et al., 2005; Hargreaves et al., 2005). Bislang existieren keine empirischen Untersuchungen, die sich mit NPC1 bedingten morphologischen Veränderungen der AE befassen. Anhand der gesammelten Daten kann jedoch ein signifikanter Einfluss der NPC1-Funktion auf das Volumen der AE angenommen werden. Die Ergebnisse der Volumenbestimmung zeigen innerhalb der scheinbehandelten Gruppe ein um 20% signifikant reduziertes Volumen der erkrankten Versuchstiere. Sowohl unter Kombinations- als auch unter Miglustattherapie erreichten die erkrankten Tiere nahezu ihr AE-Referenzvolumen (Kombi: 92,9%; Miglustat: 92,8%). HPβCD therapierte NPC1^{-/-} Mäuse wiesen lediglich 82,9% des RVs ihrer gesunden Kontrolltiere auf (**Abbildung 23, Tabelle 13**). Damit zeigt sich die HPβCD-Monotherapie, auch im Bereich der AE, den anderen Therapieregimen unterlegen und weist den kleinsten protektiven Effekt auf. NPC1-Forschungsarbeiten beschreiben das Auftreten von neurofibrillären Bündeln im Bereich der Area entorhinalis, die sich als Reaktion auf abnormale Lipidspeicherungen zu bilden scheinen (Love et al., 1995). Wie bereits beschrieben werden NFBs mit neuronalen Atrophiezonen und Volumenreduktionen assoziiert und könnten auch im

Bereich der Area entorhinalis ursächlich für den beobachteten Volumenverlust sein. Studien zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer berichten von Zelluntergängen im Bereich der AE, die mit auftretenden Gedächtnisstörungen in Verbindung gebracht werden (Price et al., 2001). Da Krankheiten der Gruppe neurodegenerativer Leiden unzählige Parallelen zueinander aufweisen, könnten derartige Neuronenverluste auch durch die NPC1-Mutation verursacht werden und Grund für die häufig auftretenden kognitiven Einbußen der Stoffwechselerkrankung sein (Price et al., 2001). In dieser Arbeit weisen der piriforme Kortex und die Area entorhinalis einen ähnlichen Volumenverlust von etwa 20% auf. Aufgrund ihrer Verschaltung untereinander und des analogen Ausmaßes abnehmender Substanz, könnte man eine gleichartige Pathogenese vermuten. Die AE lässt sich anatomisch in den medialen und lateralen entorhinalen Kortex unterteilen (Van Cauter et al., 2013). In dieser Arbeit wurde das Rindenareal während der stereologischen Quantifizierung ohne Untergliederung betrachtet. In welchem Ausmaß die Subareale von der Volumenreduktion betroffen sind, lässt sich nicht sicher sagen und macht weitere Untersuchungen notwendig.

4.5.7 Piriformer Kortex

Der piriforme Kortex (PIRI) besitzt als Part des Rhinencephalons eine wichtige Rolle bei der Bildung eines olfaktorischen Arbeitsgedächtnisses und der Diskriminierung von Gerüchen (Howard et al., 2009; Zelano et al., 2009). Innerhalb der scheintherapierten Gruppe zeigen die erkrankten Mäuse ein signifikant reduziertes Kortextvolumen von 20,3% im Vergleich zu ihren gesunden Kontrolltieren. Die Behandlungsregime erzielen im Bereich des piriformen Kortex sehr ähnliche Ergebnisse. Während die HPβCD-monotherapierte Gruppe 80,6% des PIRI-Volumens der gesunden Referenzgruppe erreicht, sind es unter Kombinationstherapie 81,3%. Die Miglustat-monotherapierten NPC1^{-/-} Versuchstiere zeigen 81,2% des Referenzvolumens ihrer gesunden Kontrollgruppe (**Abbildung 24, Tabelle 14**). Im Vergleich zur untherapierten NPC1^{-/-} Versuchsgruppe, lässt sich kein wesentlicher protektiver Effekt auf den krankheitsbedingten Volumenverlust nachweisen. Der in den Untersuchungen beobachtete drastische Volumenverlust bei untherapierten NPC1^{-/-} Mäusen könnte auf die in der Literatur beschriebenen NFBs und Cholesterolablagerungen im Bereich des PIRIs zurückzuführen sein, die häufig mit neuronalen Atrophiezonen assoziiert werden (Bobinski et al., 1996; Distl et al., 2003). Darüber hinaus hat die Gruppe um Yamada et al. (2001), neben zahlreichen weiteren Hirnarealen, NPC1 mutationsbedingte neuronale Schwellungen im Bereich des piriformen Kortex beschrieben, die nachfolgenden Apoptoseprozessen und neuronalen Volumenveränderung in der Regel vorausgehen (Pasantes-Morales & Tuz, 2006; Yamada et al., 2001). Komponenten der olfaktorischen Verschaltung sind besonders häufig im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen betroffen (Barresi et al., 2012). Die beobachtete Reduktion des piriformen Kortex, als Part des Rhinencephalons, erscheint damit plausibel. Die Genese olfaktorischer Defizite wird häufig mit der Destruktion des piriformen Kortex assoziiert, was sich anhand abnehmender olfaktorischer Leistungen auch am BALB/c-Mausmodell nachweisen ließ (Wilson et al., 2015; Witt et al., 2018). Entgegen der Daten von Meyer et al. (2018), die eine Verbesserung der olfaktorischen Leistung unter Therapie

aufzeigen, kommt es im Bereich des piriformen Kortex zu keiner wesentlichen Reduktion des krankheitsbedingten Volumenverlusts. Während der piriforme Kortex therapieresistent erscheint, wirken die Therapeutika vermutlich auf andere, an der Olfaktion beteiligte, Hirnregionen und verbessern so das Riechvermögen. Warum es im Vergleich zu weiteren betrachteten Hirnregionen zu keinem therapiebedingtem reduzierten Volumenverlust kommt, bleibt unklar.

4.6 Gewichts- und Volumenveränderungen innerhalb der therapierten NPC1^{+/+}

Versuchsgruppen

In dieser Arbeit wurden neben der Untersuchung mutationsbedingter Veränderungen limbischer Areale und möglicher Therapieeffekte auf erkrankte Tiere auch die potentiellen side-effects der verwendeten Wirkstoffe analysiert. Dafür wurden dieselben Behandlungsschemata innerhalb einer gesunden NPC1^{+/+} Versuchstiergruppe verwendet. Zu den häufigsten bekannten Nebenwirkungen der Miglustat-Therapie gehören Diarrhoe, Flatulenzen, Bauchschmerzen und allgemeines Unwohlsein (Brand et al., 2015; Champion et al., 2010). Als signifikante unerwünschte Nebenwirkung von HPβCD ist dessen Ototoxizität zu nennen, die eine Schädigung empfindlicher Neurone plausibel erscheinen lässt (Davidson et al., 2016). Des Weiteren wurde die HPβCD-Therapie mit der Reduktion des Körpergewichts in Verbindung gebracht, die vermutlich auf eine Interaktion mit Blutfetten zurückzuführen ist (Comerford et al., 2011; Schlegel et al., 2016). Zum Neurosteroid Allopregnanolon und dessen Auswirkungen auf das Körpergewicht scheint es bisher keine empirischen Untersuchungen zu geben. Bei Betrachtung des Körpergewichts der NPC1^{+/+} Behandlungsgruppe zeigten sowohl die HPβCD- (-7,7%) als auch die kombinationstherapierten (-10,0 %) Mäuse reduzierte Messwerte im Vergleich zu ihren scheinbehandelten gesunden Kontrolltieren (**Tabelle 5**). Dabei ist die Gewichtsreduktion kleiner als die der therapierten NPC1^{-/-} Versuchsmäuse (Kombi: -23,5%; HPβCD: -17,2 %) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe und höchstwahrscheinlich auf Nebenwirkungen der verwendeten Therapeutika zurückzuführen. Überraschenderweise zeigen die Miglustat therapierten NPC1^{+/+} Mäuse eine Gewichtszunahme von 12,8% (**Tabelle 5**) gegenüber ihren gesunden Vergleichstieren. Da die Miglustat therapierte NPC1^{+/+} Versuchsgruppe lediglich von einem Tier repräsentiert wird, kann das Ergebnis als nicht signifikant erachtet werden. Aufgrund der stärkeren Körpergewichtsreduktion innerhalb der kombinationstherapierten Gruppe im Vergleich zu den HPβCD-behandelten Mäusen und der Gewichtszunahme unter Miglustat, könnte man einen synergistisch negativen side-effect zwischen HPβCD und Allopregnanolon vermuten. Lässt man die nicht repräsentativen Ergebnisse der Miglustat therapierten Gruppe außer Betracht, wird aufgrund des stärkeren Volumenverlusts innerhalb der kombinationstherapierten Gruppe, der synergistische Effekt zwischen Miglustat und HPβCD wahrscheinlicher. Im Rahmen dieser Arbeit ließen sich minimal reduzierte Hirngewichte bei den HPβCD- und kombinationstherapierten NPC1^{+/+} Versuchstieren gegenüber ihren unbehandelten Kontrolltieren nachweisen (**Abbildung 16, Tabelle 6**). Die Miglustat-therapierten NPC1^{+/+} Mäuse zeigen hingegen keine Messwertdifferenz im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe (**Tabelle 6**). Andere Forschungsarbeiten berichten ebenfalls von einer Reduktion des

Hirngewichts sowohl unter Kombinations- als auch unter Miglustattherapie (Maass et al., 2015; Schlegel et al., 2016). Als Ursache wird eine reduzierte Fettspeicherung und Membranbiosynthese durch die Hemmung der Glyosylceramid-Synthase diskutiert (Treiber et al., 2007). Diese Beobachtung lässt sich anhand der generierten Daten nicht eindeutig bestätigen und der Einfluss der Therapeutika auf das Hirngewicht bleibt unklar. Überraschenderweise zeigen sich bei Betrachtung der Volumina, abhängig vom Hirnareal, heterogene statistisch nicht signifikante Messwertdifferenzen. Während sich in den Regionen CA1, CA3, des Gyrus dentatus und des Subiculus der gesunden NPC1^{+/+} Tiere unter fast jeder Therapie eine leichte Volumenzunahme zeigt, sind in den anderen betrachteten Regionen sogar Reduktionen nachweisbar. Der Volumenverlust wird in den Bereichen des Prä- und Parasubiculus, der Area entorhinalis und des piriformen Kortex besonders deutlich. Hier sind vor allem unter der HPβCD-Monotherapie Volumenreduktionen zwischen 13,5 und 20,9% im Vergleich zu ihren scheinbehandelten NPC1^{+/+} Kontrolltieren zu beobachten. Warum sich die Ergebnisse so heterogen präsentieren ist fraglich und könnte für einen unterschiedlichen Wirkeffekt der verwendeten Pharmazeutika innerhalb des limbischen Systems sprechen. Auch die Gruppe und Meyer et al. (2017) beobachtete bei der Untersuchung der Proliferationsaktivität des olfaktorischen Epithels unter Kombinations- und HPβCD-Therapie eine zunehmende Teilungsbereitschaft bei getesteten NPC1^{+/+} Tieren. Ein ähnlicher Mechanismus könnte für die beobachtete Volumenzunahme in CA1, CA3, S und DG verantwortlich sein. Des Weiteren wird Allopregnanolon als Proliferationsfaktor für neuronale Stammzellen diskutiert und kann auf diesem Weg zu einer vermehrten Zellneubildung beitragen, was die beobachtete Zunahme erklären könnte (Hernandez & Brinton, 2019). Auch Cyclodextrine stehen im Verdacht über die Stimulierung von Wachstumsfaktoren proliferativ zu wirken und eine erhöhte Mitoseleistung zu induzieren, die sich in Form einer Hirnsubstanzzunahme präsentieren könnte (Fülöp et al., 2001; Qi et al., 2015). Paradoxe Weise zeigte sich gleichzeitig eine deutliche Reduktion unter der HPβCD-Monotherapie im Bereich der Area entorhinalis, des piriformen Kortex und des Prä- und Parasubiculus, die auf zahlreiche Nebenwirkungen des Wirkstoffes zurückzuführen sein dürfte. Beispielsweise sind Cyclodextrine in der Lage sowohl Phospholipide als auch Cholesterol aus ihrer Biomembran zu lösen und damit Zellen und Neurone zu destruieren (Ottinger et al., 2014; Motoyama et al., 2009). Dies wiederum hätte einen Zelluntergang und eine Volumenreduktion zur Folge. Darüber hinaus wird innerhalb anderer Forschungsarbeiten an Tumor- und Leukämiezellen der zytotoxische Effekt von Cyclodextrinen diskutiert, als dessen Konsequenz einen Substanzverlust durch Apoptose plausibel erscheint (Motoyama et al., 2009; Yokoo et al., 2015). Wie bereits beschrieben, sind diverse unerwünschte Nebenwirkungen des Medikaments Miglustat bekannt, die Volumenreduktionen innerhalb der Area entorhinalis und des piriformen Kortex erklären könnten. Beschrieben wird häufig die Abnahme des Körpergewichts unter Miglustat, der eine verminderte Membranbiosynthese und Fettspeicherung zugrunde liegen soll (Treiber et al., 2007). Dies könnte auch innerhalb der assoziativ verschalteten Hirnregionen durch veränderte Biomembranen und nachfolgendem Zelluntergang einen Substanzverlust verursachen, der sich letztlich in Form einer Volumenreduktion präsentiert. Inwieweit

die genannten Mechanismen für die heterogenen Volumenveränderungen verantwortlich sind und warum die betrachteten Hirnareale so unterschiedlich auf die Therapieregime reagieren bleibt unklar. Weitere Studien sind notwendig, um die morphologischen Veränderungen unter Therapie abschließend zu klären.

4.7 Kritische Beurteilung der Messmethode

Die manuelle stereologische Quantifizierung und Volumetrie neuronaler Strukturen hat sich in zahlreichen Studien zur Untersuchung neurodegenerativer Prozesse bewährt. Dennoch bieten neuere Analyseverfahren, wie beispielsweise die voxelbasierte Morphometrie (VBM), einen automatisierten computergestützten Vergleich der Gehirne (Barth, 2005) und gehen mit einer höheren anatomischen Genauigkeit einher. Volumenvermessungen des Hippocampus, der Area entorhinalis und des piriformen Kortex wären in größeren Probandenkollektiven als in der vorliegenden Arbeit möglich, was die Retest-Reliabilität der Messungen verbessern würde (Jessen, 2018). Bei der hier verwendeten manuellen Methode, gestaltet sich die einheitliche Abgrenzung der betrachteten Hirnareale mithilfe eines Lichtmikroskops häufig schwierig. Eine arealespezifische Markierung oder Färbung, die eine reproduzierbare und einheitliche Begrenzung erleichtert, wäre sinnvoll. Entscheidend ist natürlich auch, was die in dieser Arbeit gemessenen Volumenreduktionen zu bedeuten haben. Diskutiert wird, ob eine progressive Volumenminderung tatsächlich als Indikator für neuronale Zelluntergänge genutzt werden kann und welche Zelllinien oder Regionen besonders vom beobachteten Substanzverlust betroffen sind (Barth, 2005). Die gleiche Frage stellt sich dementsprechend auch bei Revisionen oder Substanzverlusten unter Therapie. Sinnvoll wären zusätzliche Zellzählungen im Bereich des limbischen Systems, die Auskunft über einen möglichen Zelluntergang von Körner- oder Pyramidenzellen gäben und den Bestand der Gliazellen prüfen könnten. Des Weiteren sollte überlegt werden, wie gut die Volumenreduktion des limbischen Systems dessen tatsächlichen Qualitäts- und Funktionsverlust widerspiegeln kann und ob es nicht andere testbare Modalitäten gäbe, die sich besser zur Quantifizierung degenerativer Prozesse im Bereich des Hippocampus, der Area entorhinalis oder des piriformen Kortex eignen. Trotz allem hat sich die verwendete Cavalieri-Methode in zahlreichen Forschungsarbeiten bewährt und sich im Vergleich zu anderen Methodiken der Volumenvermessung als besonders zuverlässig erwiesen (Michel & Cruz-Orive, 1988; Özdikici, 2018; Rosen & Harry, 1990). Zu einer genaueren Analyse des limbischen Systems NPC1-defizienter Mäuse sind zusätzliche Zellzählungen oder Verhaltens- und Orientierungstests notwendig, deren Ergebnisse mit den vorliegenden Daten der Volumenvermessungen verglichen werden sollten.

4.8 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, insbesondere in Verbindung mit weiteren Daten der NPC1-Arbeitsgruppe der Universität Rostock (Hovakimyan et al., 2013a; Hovakimyan et al., 2013b; Hovakimyan et al., 2011; Maaß, 2014; Maass et al., 2015; Meyer et al., 2017; Schlegel et al., 2016; Witt et al., 2018, Heimes 2019 eingereicht), dass Morbus Niemann-Pick C1, neben der nachgewiesenen Beeinträchtigung des Cerebellums oder der Destruktion olfaktorischer Epithelien und zentraler Verschaltungsebenen, auch zur Degeneration des limbischen Systems führt. Für diese Erkenntnis wurden sowohl die Subregionen des Hippocampus (CA1, CA2, DG, S, PS), die Area entorhinalis, der piriforme Kortex als auch das Hirn- und Körpergewicht der Versuchsmäuse auf NPC1-mutationsbedingte Veränderungen untersucht. Um klinisch relevante Daten zu generieren, erhielten auch drei vielversprechende Therapieregime Einzug in den Untersuchungsablauf. Zahlreiche Forschungsergebnisse bezüglich der Kombinations-, Miglustat- und HPßCD-Monotherapie, machten deren Einsatz auch in der vorliegenden Arbeit notwendig. Es wurden sowohl kranke als auch gesunde Versuchstiere nach dem gleichen Schemata behandelt. Als Kontrollgruppe diente jeweils die scheintherapierte gesunde NPC1^{+/+} Versuchgruppe, um einheitliche Ergebnisdarstellungen generieren zu können. Eine Reduktion des krankheitsbedingten Gewichts- oder Volumenverlust wird dabei stets als protektiver Faktor gewertet. Bei Betrachtung des Körpergewichts zeigen sich in jeder Behandlungsgruppe und innerhalb der scheintherapierten Gruppe signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Die erkrankten Tiere weisen dabei stets geringere Körpergewichte gegenüber ihren gesunden Kontrolltieren auf. Die krankheitsbedingte Abnahme des Körpergewichts kann durch alle drei Therapieregime abgeschwächt werden, wobei sich die Miglustat-Monotherapie den anderen beiden überlegen zeigt. Im Hinblick auf die Hirngewichte zeigt sich ein ähnliches aber nicht so drastisches Ergebnis. Es zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede in allen Behandlungsgruppen und innerhalb der scheintherapierten Gruppe zwischen den Genotypen. Die erkrankten Tiere weisen dabei geringere Hirngewichte als ihre gesunden Kontrolltiere auf. Die mutationsbedingte Reduktion des Hirngewichts kann nur minimal durch die Therapieregime abgeschwächt werden. Die Daten der Volumenvermessungen zeigen signifikante Messwertunterschiede innerhalb der scheintherapierten Gruppe in den Regionen CA1, DG, S, AE und PIRI zwischen den Genotypen. Dabei weisen die erkrankten Tiere stets kleinere Frischvolumina als ihre gesunden unbehandelten Kontrolltiere auf. Der beobachtete krankheitsbedingte Volumenverlust lässt sich in fast allen Regionen, mit Ausnahme des piriformen Kortex, durch die Therapieregime abschwächen. Die HPßCD-Monotherapie scheint dabei den anderen beiden unterlegen zu sein, sodass der verminderte Volumenverlust wahrscheinlich hauptsächlich auf die Miglustatwirkung zurückzuführen ist. Auffällig ist, dass sich in den Regionen CA3 und des Prä- und Parasubiculums kein signifikanter Volumenunterschied zwischen den Genotypen nachweisen lässt. CA3 und PS präsentieren sich weitestgehend resistent gegenüber der neurodegenerativen Prozesse des NPC1. Interessant ist auch, dass sich unter keiner Therapie der mutationsbedingte Volumenverlust im Bereich des piriformen Kortex

abschwächen lässt. Was die heterogene Wirkung der verwendeten Medikamente innerhalb des neuronalen Systems verdeutlicht. Innerhalb der gesunden Versuchsgruppe wurden die Therapieregime auf mögliche side-effects untersucht. Die Behandlungsgruppen zeigen in Abhängigkeit des betrachteten Hirnareals ein heterogenes Bild, das kein klares Wirkungsmuster darstellen lässt. Während einige Regionen, wie beispielsweise CA1, unter jeder Therapie eine Volumenzunahme verzeichnen, weisen der Gyrus dentatus oder der piriforme Kortex sogar ein reduziertes Volumen auf. Zusammengefasst sprechen die beobachteten Volumenveränderungen für deutliche Degenerationsprozesse innerhalb der Subregionen des Hippocampus, der Area entorhinalis und des piriformen Kortex unter der NPC1-Mutation. Welche Zelllinien dabei besonders stark betroffen sind und wie genau der Substanzverlust zustande kommt, muss in weiteren Forschungsarbeiten geklärt werden. Inwieweit die dargestellten Volumenverluste die häufig beobachteten kognitiven Einbußen NPC1- erkrankter Patienten oder Versuchstiere verursachen, bleibt unklar. Weitere Untersuchungen in Form von Verhaltens- oder Orientierungstests gekoppelt mit Zellzählungen und Volumenvermessungen des limbischen Systems wären ein weiterer Ansatz für zukünftige Forschungsarbeiten. Möglich ist auch die Ausweitung der von Walterfang et. al. (2013) beschriebenen voxelbasierten Morphometrie des Hippocampus NPC1 erkrankter Patienten mit gleichzeitiger Durchführung neuropsychiatrischer Untersuchungen, um tatsächliche Funktionseinschränkungen des limbischen Systems aufzuzeigen. Alle generierten Daten und Erkenntnisse kommen den erkrankten Patienten und behandelnden Ärzten zugute, geben Hoffnung und können teilweise auch auf andere Lipidspeicherkrankheiten übertragen werden. Damit ist die Erforschung des Morbus Niemann Pick Typ C1, trotz niedriger Prävalenzzahlen, unerlässlich. Statistisch gesehen leiden vier Millionen Deutsche an einer von ungefähr 8000 seltenen Erkrankungen wie NPC1, was die Notwendigkeit der wissenschaftlichen Ergründung seltener Erkrankungen verdeutlicht (Bundesgesundheitsministerium, 2020; Deutschlandfunk, 2020).

5 Literaturverzeichnis

- Ag's-Balboa, R. C., Pinna, G., Zhubi, A., Maloku, E., Veldic, M., Costa, E., & Guidotti, A. (2006). Characterization of brain neurons that express enzymes mediating neurosteroid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(39), 14602–14607.
- Ahmad, I., Lope-Piedrafita, S., Bi, X., Hicks, C., Yao, Y., Yu, C., Chaitkin, E., Howison, C. M., Weberg, L., Trouard, T. P., & others. (2005). Allopregnanolone treatment, both as a single injection or repetitively, delays demyelination and enhances survival of Niemann-Pick C mice. *Journal of Neuroscience Research*, 82(6), 811–821.
- Alam, M. S., Getz, M., & Haldar, K. (2016). Chronic administration of an HDAC inhibitor treats both neurological and systemic Niemann-Pick type C disease in a mouse model. *Science Translational Medicine*, 8(326), 326ra23–326ra23.
- Altmann, S. W., Davis, H. R., Zhu, L., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P. N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., & others. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, 303(5661), 1201–1204.
- Alvarez, A. R., Sandoval, P. C., Leal, N. R., Castro, P. U., & Kosik, K. S. (2004). Activation of the neuronal c-Abl tyrosine kinase by amyloid- β -peptide and reactive oxygen species. *Neurobiology of Disease*, 17(2), 326–336.
- Amaral, D., Andersen, P., O'Keefe, J., Morris, R., & others. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility—linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6), 335.
- Ashe, K. H. (2001). Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Learning & Memory*, 8(6), 301–308.
- Bardai, F. H., Price, V., Zaayman, M., Wang, L., & D'Mello, S. R. (2012). Histone deacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death. *Journal of Biological Chemistry*, 287(42), 35444–35453.
- Barnes, C. A., Rao, G., & Orr, G. (2000). Age-related decrease in the Schaffer collateral-evoked EPSP in awake, freely, behaving rats. *Neural Plasticity*, 7(3), 167–178.
- Barresi, M., Ciurleo, R., Giacoppo, S., Cuzzola, V. F., Celi, D., Bramanti, P., & Marino, S. (2012). Evaluation of olfactory dysfunction in neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 323(1–2), 16–24.
- Barth, M. (2005). *Funktionelle Bildgebung in Psychiatrie und Psychotherapie: methodische Grundlagen und klinische Anwendungen; mit 11 Tabellen*. Schattauer Verlag.
- Bartsch, T., Döhring, J., Rohr, A., Jansen, O., & Deuschl, G. (2011). CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and autonoetic consciousness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(42), 17562–17567.
- Baudry, M., Yao, Y., Simmons, D., Liu, J., & Bi, X. (2003). Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: immunohistochemical observations of microglia and astroglia. *Experimental Neurology*, 184(2), 887–903.
- Beck, M., & Lackner, K. J. (2007). 43 Lysosomale Speichererkrankungen. *Medizinische Therapie*, 2008.

- Belmatoug, N., Burlina, A., Giraldo, P., Hendriksz, C. J., Kuter, D. J., Mengel, E., & Pastores, G. M. (2011). Gastrointestinal disturbances and their management in miglustat-treated patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(5), 991.
- Beltray, E. P., Liu, B., Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2007). *Lysosomal unesterified cholesterol content correlates with liver cell death in murine Niemann-Pick type C disease*. 48. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600488-JLR200>.
- Beltray, E. P., Richardson, J. A., Horton, J. D., Turley, S. D., & Dietschy, J. M. (2005). Cholesterol accumulation and liver cell death in mice with Niemann-Pick type C disease. *Hepatology*, 42(4), 886–893.
- Bir, S. C., Ambekar, S., Kukreja, S., & Nanda, A. (2015). *Julius Caesar Arantius (Giulio Cesare Aranzi, 1530–1589) and the hippocampus of the human brain: history behind the discovery*. 122(April), 971–975. <https://doi.org/10.3171/2014.11.JNS132402>. Disclosure.
- Bischofberger, J., & Schmidt-Hieber, C. (2006). Adulte Neurogenese im Hippokampus. *E-Neuroforum*, 12(3), 212–221.
- Bobinski, M., Wegiel, J., Wisniewski, H. M., Tarnawski, M., Bobinski, M., Reisberg, B., De Leon, M. J., & Miller, D. C. (1996). Neurofibrillary pathology—correlation with hippocampal formation atrophy in Alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, 17(6), 909–919.
- Boccarda, C. N., Sargolini, F., Thoresen, V. H., Solstad, T., Witter, M. P., Moser, E. I., & Moser, M.-B. (2010). Grid cells in pre-and parasubiculum. *Nature Neuroscience*, 13(8), 987.
- Bornemann, A., & Harzer, K. (2015). Lysosomale Speicherkrankheiten. *Der Pathologe*, 36(5), 485–493.
- Bradbury, A., Bagel, J., Sampson, M., Farhat, N., Ding, W., Swain, G., Prociuk, M., Donnell, P. O., Drobacz, K., Gurda, B., Wassif, C., Remaley, A., Porter, F., & Vite, C. (2016). *Cerebrospinal Fluid Calbindin D Concentration as a Biomarker of Cerebellar Disease Progression in Niemann-Pick Type C1 Disease*. *August*, 254–261.
- Brady, R. (n.d.). 0.(1983) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L., and Brown, M. s., eds) pp. 831-841. McGraw-Hill Publications, Minneapolis, MN.
- Brady, R. O., Kanfer, J. N., Mock, M. B., & Fredrickson, D. S. (1966). The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(2), 366.
- Brand, M., Muller, A., Alsop, J., van Schaik, I. N., Bembi, B., & Hughes, D. (2015). Results from a 9-year Intensive Safety Surveillance Scheme (IS3) in miglustat (Zavesca®)-treated patients. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 24(3), 329–333.
- Bräuer, A. U., Kuhla, A., Holzmann, C., Wree, A., & Witt, M. (2019). Current Challenges in Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms in Niemann-Pick Disease Type C1. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4392.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L., & others. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232(4746), 34–47.
- Burton, G. W., & Traber, M. G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, 10(1), 357–382.
- Byun, K., Kim, J., Kim, N., Kang, J., Won, M., Jeong, G., Jo, S., & Lee, B. (2011). Alteration of the CNS pathway to the hippocampus in a mouse model of Niemann – Pick , type C disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 42(1), 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.04.003>.

- Carmichael, S. T., Clugnet, M.-C., & Price, J. L. (1994). Central olfactory connections in the macaque monkey. *Journal of Comparative Neurology*, 346(3), 403–434.
- Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., & others. (1997). Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*, 277(5323), 228–231.
- Champion, H., Ramaswami, U., Imrie, J., Lachmann, R. H., Gallagher, J., Cox, T. M., & Wraith, J. E. (2010). Dietary modifications in patients receiving miglustat. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 33, 379–383.
- Chandler, R. J., Williams, I. M., Gibson, A. L., Davidson, C. D., Incao, A. A., Hubbard, B. T., Porter, F. D., Pavan, W. J., & Venditti, C. P. (2017). Systemic AAV9 gene therapy improves the lifespan of mice with Niemann-Pick disease, type C1. *Human Molecular Genetics*, 26(1), 52–64.
- Comerford, K. B., Artiss, J. D., Jen, K.-L. C., & Karakas, S. E. (2011). The Beneficial Effects α -Cyclodextrin on Blood Lipids and Weight Loss in Healthy Humans. *Obesity*, 19(6), 1200–1204.
- Cooper, D. C., Klipec, W. D., Fowler, M. A., & Ozkan, E. D. (2006). A role for the subiculum in the brain motivation/reward circuitry. *Behavioural Brain Research*, 174(2), 225–231.
- Cougnoux, A., Cluzeau, C., Mitra, S., Li, R., Williams, I., Burkert, K., Xu, X., Wassif, C. A., Zheng, W., & Porter, F. D. (2016). Necroptosis in Niemann-Pick disease, type C1: a potential therapeutic target. *Cell Death & Disease*, 7(3), e2147–e2147.
- Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., Van Weely, S., Hreb\'ıcek, M., Platt, F., Butters, T., Dwek, R., Moyses, C., & others. (2000). Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *The Lancet*, 355(9214), 1481–1485.
- Crumling, M. A., King, K. A., & Duncan, R. K. (2017). Cyclodextrins and Iatrogenic Hearing Loss: New Drugs with Significant Risk. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 355. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00355>.
- Crumling, M. A., Liu, L., Thomas, P. V., Benson, J., Kanicki, A., Kabara, L., Hälsey, K., Dolan, D., & Duncan, R. K. (2012). Hearing loss and hair cell death in mice given the cholesterol-chelating agent hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *PloS One*, 7(12).
- D'Arcangelo, G., Grossi, D., Racaniello, M., Cardinale, A., Zaratti, A., Rufini, S., Cutarelli, A., Tancredi, V., Merlo, D., & Frank, C. (2016). Miglustat reverts the impairment of synaptic plasticity in a mouse model of NPC disease. *Neural Plasticity*, 2016.
- Davidson, C. D., Ali, N. F., Micsenyi, M. C., Stephney, G., Renault, S., Dobrenis, K., Ory, D. S., Vanier, M. T., & Walkley, S. U. (2009). Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PloS One*, 4(9).
- Davidson, C. D., Fishman, Y. I., Puskás, I., Szemán, J., Sohajda, T., McCauliff, L. A., Sikora, J., Storch, J., Vanier, M. T., Szente, L., & others. (2016). Efficacy and ototoxicity of different cyclodextrins in Niemann-Pick C disease. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 3(5), 366–380.
- Davies, J. P., & Ioannou, Y. A. (2000). Topological analysis of NPC1 reveals that the membrane orientation of the putative sterol sensing domain is identical to those of HMG-CoA-R and SCAP. *J. Biol. Chem*, 275, 24367–24374.

- Deffieu, M. S., & Pfeffer, S. R. (2011). Niemann–Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(47), 18932–18936.
- Degterev, A., Hitomi, J., Gernscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G. D., Yuan, C., Wagner, G., & others. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature Chemical Biology*, 4(5), 313.
- Distl, R., Treiber-Held, S., Albert, F., Meske, V., Harzer, K., & Ohm, T. G. (2003). Cholesterol storage and tau pathology in Niemann–Pick type C disease in the brain. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(1), 104–111.
- Döring, L. (1982). *Ontogenese des Areal SMI im Cortex der Albinoratte: quantitative Untersuchungen*.
- Duvernoy, H. M. (2005). *The Human Hippocampus : Functional Anatomy Vascularization and erial Sections with MRI* (Third Edit). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Eriksson, T. M. (2012). *Serotonin in emotional memory processes: neuropharmacological studies with emphasis on depression*. Inst för fysiologi och farmakologi/Dept of Physiology and Pharmacology.
- Fabrizio Vacca, Stefania Vossio, Vincent Mercier, Dimitri Moreau, Shem Johnson, Cameron C. Scott, Jonathan Paz Montoya†, M. M. and J. G. (2019). Cyclodextrin triggers MCOLN1-dependent endo-lysosome secretion in Niemann-Pick type C cells. *Journal of Lipid Research*, 60(4), 832–843.
- Fala, L. (2019). *Zulresso (Brexanolone) First Drug Approved by the FDA Specifically for Postpartum Depression in Adults*.
- Falkai, P., & Bogerts, B. (1986). Cell loss in the hippocampus of schizophrenics. *European Archives of Psychiatry and Neurological Sciences*, 236(3), 154–161.
- Fernandez-Valero, E. M., Ballart, A., Iturriaga, C., Lluch, M., Macias, J., Vanier, M. T., Pineda, M., & Coll, M. J. (2005). Identification of 25 new mutations in 40 unrelated Spanish Niemann-Pick type C patients: genotype-phenotype correlations. *Clinical Genetics*, 68(3), 245–254.
- Fu, R., Yanjanin, N. M., Bianconi, S., Pavan, W. J., & Porter, F. D. (2010). Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C. *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(2–3), 214–218.
- Fülöp, T., Douziech, N., Goulet, A.-C., Desgeorges, S., Linteau, A., Lacombe, G., & Dupuis, G. (2001). Cyclodextrin modulation of T lymphocyte signal transduction with aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(13), 1413–1430.
- Galanaud, D., Tourbah, A., Lehericy, S., Leveque, N., Heron, B., de Villemeur, T. B., Guffon, N., Feillet, F., Baumann, N., Vanier, M. T., & others. (2009). 24 month-treatment with miglustat of three patients with Niemann-Pick disease type C: follow up using brain spectroscopy. *Molecular Genetics and Metabolism*, 96(2), 55–58.
- Garver, W. S., Francis, G. A., Jelinek, D., Shepherd, G., Flynn, J., Castro, G., Walsh Vockley, C., Coppock, D. L., Pettit, K. M., Heidenreich, R. A., & others. (2007). The National Niemann–Pick C1 disease database: report of clinical features and health problems. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 143(11), 1204–1211.
- Garver, W. S., Jelinek, D., Oyarzo, J. N., Flynn, J., Zuckerman, M., Krishnan, K., Chung, B. H., & Heidenreich, R. A. (2007). *Characterization of Liver Disease and Lipid Metabolism in the Niemann-Pick C1 Mouse*. 516, 498–516. <https://doi.org/10.1002/jcb.21200>.

- German, D C, Liang, C.-L., Song, T., Yazdani, U., Xie, C., & Dietschy, J. M. (2002). Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: glial involvement. *Neuroscience*, 109(3), 437–450.
- German, D C, Quintero, E. M., Liang, C.-L., Xie, C., & Dietschy, J. M. (2001). Degeneration of neurons and glia in the Niemann-Pick C mouse is unrelated to the low-density lipoprotein receptor. *Neuroscience*, 105(4), 999–1005.
- German, Dwight C, Quintero, E. M., Liang, C.-L., Ng, B., Punia, S., Xie, C., & Dietschy, J. M. (2001). Selective neurodegeneration, without neurofibrillary tangles, in a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Journal of Comparative Neurology*, 433(3), 415–425.
- Giese, A.-K., Mascher, H., Grittner, U., Eichler, S., Kramp, G., Lukas, J., te Vrugte, D., Al Eisa, N., Cortina-Borja, M., Porter, F. D., & others. (2015). A novel, highly sensitive and specific biomarker for Niemann-Pick type C1 disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 10(1), 78.
- Gilbert, E. F., Callahan, J., Viseskul, C., & Opitz, J. M. (1981). Niemann-Pick disease type C. *European Journal of Pediatrics*, 136(3), 263–274.
- Gilbert, P. E., & Brushfield, A. M. (2009). The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: a process oriented behavioral assessment. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 774–781.
- Gottfried, J. A. (2010). Central mechanisms of odour object perception. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(9), 628–641.
- Grau, A. J., Weisbrod, M., Hund, E., & Harzer, K. (2003). Morbus Niemann-Pick Typ C. *Der Nervenarzt*, 74(10), 900–905. <https://doi.org/10.1007/s00115-003-1577-3>
- Greenberg, C. R., Barnes, J. G., Kogan, S., & Seargeant, L. E. (2015). A rare case of Niemann--Pick disease type C without neurological involvement in a 66-year-old patient. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 3, 18–20.
- Gregoret, I., Lee, Y.-M., & Goodson, H. V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology*, 338(1), 17–31.
- Griffin, L. D., Gong, W., Verot, L., & Mellon, S. H. (2004). Niemann--Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nature Medicine*, 10(7), 704–711.
- Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2005). Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), 801–806.
- Halliday, G. (2017). Pathology and hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 16(11), 862–864.
- Hargreaves, E. L., Rao, G., Lee, I., & Knierim, J. J. (2005). Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science*, 308(5729), 1792–1794.
- Harzer, K., Ruprecht, K. W., Seuffer-Schulze, D., & Jans, U. (1978). Morbus Niemann-Pick Typ B—enzymatisch gesichert—mit unerwarteter retinaler Beteiligung. *Albrecht von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 206(2), 79–88.
- Heckers, S., & Konradi, C. (2002). Hippocampal neurons in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission*, 109(5–6), 891–905.
- Helquist, P., Maxfield, F. R., Wiech, N. L., & Wiest, O. (2013). Treatment of Niemann--pick type C disease by histone deacetylase inhibitors. *Neurotherapeutics*, 10(4), 688–697.

- Hernandez, G. D., & Brinton, R. D. (2019). Allopregnanolone as a Therapeutic to Regenerate the Degenerated Brain. In *est eroids' Effects on Brain, Heart and Vessels* (pp. 111–123). Springer.
- Higgins, M. E., Davies, J. P., Chen, F. W., & Ioannou, Y. A. (1999). Niemann–Pick C1 is a late endosome-resident protein that transiently associates with lysosomes and the trans-Golgi network. *Molecular Genetics and Metabolism*, 68(1), 1–13.
- Hovakimyan, M., Maass, F., Petersen, J., Holzmann, C., Witt, M., Lukas, J., Frech, M. J., Rolfs, A., Wree, A., & Hu, R. (2013a). *Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann-Pick Type C1 mice*. 252, 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.08.001>.
- Hovakimyan, M1, Maass, F., Petersen, J., Holzmann, C., Witt, M., Lukas, J., Frech, M. J., Hübner, R., Rolfs, A., & Wree, A. (2013a). Combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat improves motor but not cognitive functions in Niemann–Pick Type C1 mice. *Neuroscience*, 252, 201–211.
- Hovakimyan, Marina, Meyer, A., Lukas, J., Luo, J., Gudziol, V., Hummel, T., Rolfs, A., Wree, A., & Witt, M. (2013b). Olfactory deficits in Niemann-Pick type C1 (NPC1) disease. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082216>
- Hovakimyan, Marine, Stachs, O., Reichard, M., Mascher, H., Lukas, J., Frech, M. J., Guthoff, R., Witt, M., Rolfs, A., & Wree, A. (2011). Morphological Alterations of the Cornea in the Mouse Model of Niemann–Pick Disease Type C1. *Cornea*, 30(7), 796–803.
- Howard, J. D., Plailly, J., Grueschow, M., Haynes, J.-D., & Gottfried, J. A. (2009). Odor quality coding and categorization in human posterior piriform cortex. *Nature Neuroscience*, 12(7), 932.
- Hughes, M. P., Smith, D. A., Morris, L., Fletcher, C., Colaco, A., Huebecker, M., Tordo, J., Palomar, N., Massaro, G., Henckaerts, E., & others. (2018). AAV9 intracerebroventricular gene therapy improves lifespan, locomotor function and pathology in a mouse model of Niemann–Pick type C1 disease. *Human Molecular Genetics*, 27(17), 3079–3098.
- Irie, T., Fukunaga, K., & Pitha, J. (1992). Hydroxypropylcyclodextrins in parenteral use. I: Lipid dissolution and effects on lipid transfers in vitro. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(6), 521–523.
- Ishizuka, N., Weber, J., & Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 295(4), 580–623.
- Jacobson, L., & Sapolsky, R. (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrine Reviews*, 12(2), 118–134.
- Jan, M. M. S., & Camfield, P. R. (1998). Nova Scotia Niemann-Pick disease (type D): clinical study of 20 cases. *Journal of Child Neurology*, 13(2), 75–78.
- Jeong, M. S., Bae, J., & Jin, H. K. (2019). *Animal Cells and Systems Vascular endothelial growth factor improves the therapeutic effects of cyclodextrin in Niemann- Pick type C mice*. 8354. <https://doi.org/10.1080/19768354.2019.1651768>.
- Jessen, F. (2018). *Handbuch Alzheimer-Krankheit: Grundlagen--Diagnostik--Therapie--Versorgung--Prävention*. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- Kapur, R., Donohue, C., Jelinek, D., & Erickson, R. P. (2009). Amelioration of enteric neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick C by Npc1 expression in enteric glia. *Journal of Neuroscience Research*, 87(13), 2994–3001.

- Karout, M., Miesch, M., Geoffroy, P., Kraft, S., Hofmann, H.-D., Mensah-Nyagan, A. G., & Kirsch, M. (2016). Novel analogs of allopregnanolone show improved efficiency and specificity in neuroprotection and stimulation of proliferation. *Journal of Neurochemistry*, 139(5), 782–794.
- Kelly, D. A., Portmann, B., Mowat, A. P., Sherlock, S., & Lake, B. D. (1993). Niemann-Pick disease type C: diagnosis and outcome in children, with particular reference to liver disease. *The Journal of Pediatrics*, 123(2), 242–247.
- Kerr, K. M., Agster, K. L., Furtak, S. C., & Burwell, R. D. (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region: the lateral and medial entorhinal areas. *Hippocampus*, 17(9), 697–708.
- Kesner, R. P. (2007). Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning & Memory*, 14(11), 771–781.
- Kinnunen, K. M., Cash, D. M., Poole, T., Frost, C., Benzinger, T. L. S., Ahsan, R. L., Leung, K. K., Cardoso, M. J., Modat, M., Malone, I. B., & others. (2018). Presymptomatic atrophy in autosomal dominant Alzheimer's disease: A serial magnetic resonance imaging study. *Alzheimer's & Dementia*, 14(1), 43–53.
- Kjelvik, G., Evensmoen, H. R., Brezova, V., & Häberg, A. K. (2012). The human brain representation of odor identification. *Journal of Neurophysiology*, 108(2), 645–657.
- Klein, A., Amigo, L., Retamal, M. J., Morales, M. G., Miquel, J. F., Rigotti, A., & Zanlungo, S. (2006). NPC2 is expressed in human and murine liver and secreted into bile: potential implications for body cholesterol homeostasis. *Hepatology*, 43(1), 126–133.
- Kohlschütter, A. (2015). *Neurodegenerative Krankheiten der grauen Hirnsubstanz. Typ 2*, 1–13. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-54671-6>.
- Kopsch, F., & Rauber, A. (1922). *Lehrbuch und atlas der anatomie des menschen*. Georg Thieme.
- Kretschmann, H. J., & others. (1974). *Wachstumsparameter des Hirns und seiner Regionen bei Albinomaus, Tupaia belangeri und SFP-Katze*, *Anat Anz (Erg H)*, 138, 517-525.
- Kretschmann, H. J., Tafesse, U., & Herrmann, A. (1982). Different volume changes of cerebral cortex and white matter during histological preparation. *Microscopica Acta*, 86(1), 13–24.
- Kropff, E., Carmichael, J. E., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2015). Speed cells in the medial entorhinal cortex. *Nature*, 523(7561), 419–424.
- Kulkarni, A., Caporali, P., Dolas, A., Johny, S., Goyal, S., Dragotto, J., Macone, A., Jayaraman, R., & Fiorenza, M. T. (2018). Linear Cyclodextrin Polymer Prodrugs as Novel Therapeutics for Niemann-Pick Type C1 Disorder. *Scientific Reports*, February, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27926-9>
- Lachmann, R. H., Vruchte, D., Lloyd-evans, E., Reinkensmeier, G., Sillence, D. J., Fernandez-guillen, L., Dwek, R. A., Butters, T. D., Cox, T. M., & Platt, F. M. (2004). *Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann – Pick disease type C. 16*, 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.05.002>
- Larsen, L. B., Ravn, P., Boisen, A., Berglund, L., & Petersen, T. E. (1997). Primary structure of EPV20, a secretory glycoprotein containing a previously uncharacterized type of domain. *European Journal of Biochemistry*, 243(1–2), 437–441.
- Lee, I., Yoganarasimha, D., Rao, G., & Knierim, J. J. (2004). Comparison of population coherence of place cells in hippocampal subfields CA1 and CA3. *Nature*, 430(6998), 456–459.
- Lewis, F. T. (1923). The significance of the term hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 35(3), 213–230.

- Li, H., Repa, J. J., Valasek, M. A., Beltroy, E. P., Turley, S. D., German, D. C., & Dietschy, J. M. (2005). Molecular, anatomical, and biochemical events associated with neurodegeneration in mice with Niemann-Pick type C disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(4), 323–333.
- Li, W., Howard, J. D., & Gottfried, J. A. (2010). Disruption of odour quality coding in piriform cortex mediates olfactory deficits in Alzheimer's disease. *Brain*, 133(9), 2714–2726.
- Liao, G., Cheung, S., Galeano, J., Ji, A. X., Qin, Q., & Bi, X. (2009). Allopregnanolone treatment delays cholesterol accumulation and reduces autophagic/lysosomal dysfunction and inflammation in *Npc1*^{-/-} mouse brain. *Brain Research*, 1270, 140–151.
- Liscum, L. (2000). Niemann-Pick type C mutations cause lipid traffic jam. *Traffic*, 1(3), 218–225.
- Liu, B., Li, H., Repa, J. J., Turley, S. D., & Dietschy, J. M. (2008). Genetic variations and treatments that affect the lifespan of the NPC1 mouse. *Journal of Lipid Research*, 49(3), 663–669.
- Liu, B., Ramirez, C. M., Miller, A. M., Repa, J. J., Turley, S. D., & Dietschy, J. M. (2010). Cyclodextrin overcomes the transport defect in nearly every organ of NPC1 mice leading to excretion of sequestered cholesterol as bile acid. *Journal of Lipid Research*, 51(5), 933–944.
- Liu, J. X., Pinnock, S. B., & Herbert, J. (2011). Novel control by the CA3 region of the hippocampus on neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat. *PloS One*, 6(3).
- Lloyd-Evans, E., Morgan, A. J., He, X., Smith, D. A., Elliot-Smith, E., Sillence, D. J., Churchill, G. C., Schuchman, E. H., Galione, A., & Platt, F. M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nature Medicine*, 14(11), 1247.
- Lloyd-Evans, E., Pelled, D., Riebeling, C., Bodennec, J., de-Morgan, A., Waller, H., Schiffmann, R., & Futerman, A. H. (2003). Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23594–23599.
- Lloyd-Evans, E., & Platt, F. M. (2010). Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic*, 11(4), 419–428.
- Lloyd-Evans, E., & Platt, F. M. (2011). Lysosomal Ca²⁺ homeostasis: role in pathogenesis of lysosomal storage diseases. *Cell Calcium*, 50(2), 200–205.
- Löffler, G. (Ed.). (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9., vollst). Springer.
- Lope-Piedrafita, S., Totenhagen, J. W., Hicks, C. M., Erickson, R. P., & Trouard, T. P. (2008). MRI detects therapeutic effects in weanling Niemann-Pick type C mice. *Journal of Neuroscience Research*, 86(12), 2802–2807.
- Löscher, Wolfgang Ebert, U. (1996). The role of the piriform cortex in kindling. *Progress in Neurobiology*, 50(5–6), 427–481.
- Lossos, A., Schlesinger, I., Okon, E., Abramsky, O., Bargal, R., Vanier, M. T., & Zeigler, M. (1997). Adult-onset Niemann-Pick type C disease: Clinical, biochemical, and genetic study. *Archives of Neurology*, 54(12), 1536–1541.
- Love, S., Bridges, L. R., & Case, C. P. (1995). Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Brain*, 118(1), 119–129.
- Luan, Z., Saito, Y., Miyata, H., Ohama, E., Ninomiya, H., & Ohno, K. (2008). Brainstem neuropathology in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Journal of the Neurological Sciences*, 268(1–2), 108–116.

- Maaß, F. (2014) Dissertation: *Funktionelle und morphologische Veränderungen im Tiermodell von Morbus Niemann-Pick Typ C1 unter Einfluss der SRT/BPT-Kombinationstherapie*.
- Maass, F., Petersen, J., Hovakimyan, M., Schmitt, O., Witt, M., Hawlitschka, A., Lukas, J., Rolfs, A., & Wree, A. (2015). *Reduced Cerebellar Neurodegeneration After Combined Therapy With Cyclodextrin / Allopregnanolone and Miglustat in NPC1 : A Mouse Model of Niemann-Pick Type C1 Disease*. 442(September 2014), 433–442. <https://doi.org/10.1002/jnr.23509>.
- Mann, D. M. A., Yates, P. O., & Marcyniuk, B. (1985). Some morphometric observations on the cerebral cortex and hippocampus in presenile Alzheimer's disease, senile dementia of Alzheimer type and Down's syndrome in middle age. *Journal of the Neurological Sciences*, 69(3), 139–159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-510X\(85\)90129-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0022-510X(85)90129-7).
- Marucci, G., Rubboli, G., & Giulioni, M. (2010). Role of dentate gyrus alterations in mesial temporal sclerosis. *Clinical Neuropathology*, 29(1), 32–35.
- Maue, R. A., Burgess, R. W., Wang, B., Wooley, C. M., Seburn, K. L., Vanier, M. T., Rogers, M. A., Chang, C. C., Chang, T.-Y., Harris, B. T., & others. (2012). A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations. *Human Molecular Genetics*, 21(4), 730–750.
- Mazzacuva, F., Mills, P., Mills, K., Camuzeaux, S., Gissen, P., Nicoli, E.-R., Wassif, C., te Vruchte, D., Porter, F. D., Maekawa, M., & others. (2016). Identification of novel bile acids as biomarkers for the early diagnosis of Niemann-Pick C disease. *FEBS Letters*, 590(11), 1651–1662.
- Mellon, S. H., & Griffin, L. D. (2002). Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(1), 35–43.
- Mengel, E., Beck, M., Das, A. M., Ebinger, F., Koch, S., Klünemann, H. H., Rohrbach, M., Runz, H., Rutsch, F., & Korenke, G. C. (2012). Morbus Niemann-Pick Typ C. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, 160(1), 47–54.
- Mesmin, B., & Maxfield, F. R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 636–645.
- Meyer, A., Wree, A., Günther, R., Holzmann, C., Schmitt, O., Rolfs, A., & Witt, M. (2017). Increased regenerative capacity of the olfactory epithelium in Niemann-Pick disease type C1. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 777.
- Meyer, M., Garay, L. I., Kruse, M. S., Lara, A., Gargiulo-Monachelli, G., Schumacher, M., Guennoun, R., Coirini, H., De Nicola, A. F., & Deniselle, M. C. G. (2017). Protective effects of the neurosteroid allopregnanolone in a mouse model of spontaneous motoneuron degeneration. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 174, 201–216.
- Michel, R. P., & Cruz-Orive, L. M. (1988). Application of the Cavalieri principle and vertical sections method to lung: estimation of volume and pleural surface area. *Journal of Microscopy*, 150(2), 117–136.
- Millat, G., Marçais, C., Tomasetto, C., Chikh, K., Fensom, A. H., Harzer, K., Wenger, D. A., Ohno, K., & Vanier, M. T. (2001). Niemann-Pick C1 disease: correlations between NPC1 mutations, levels of NPC1 protein, and phenotypes emphasize the functional significance of the putative sterol-sensing domain and of the cysteine-rich luminal loop. *The American Journal of Human Genetics*, 68(6), 1373–1385.
- Miyawaki, S., Mitsuoka, S., Sakiyama, T., & Kitagawa, T. (1982). Sphingomyelinosis, a new mutation in the mouse: a model of Niemann-Pick disease in humans. *Journal of Heredity*, 73(4), 257–263.

- Morris, J. A., Zhang, D., Coleman, K. G., Nagle, J., Pentchev, P. G., & Carstea, E. D. (1999). The genomic organization and polymorphism analysis of the human Niemann-Pick C1 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(2), 493–498.
- Morris, M. D. (1982). *Lysosome Lipid Storage Disorder in NCTR-BALB / c Mice*. 140–149.
- Motoyama, K., Kameyama, K., Onodera, R., Araki, N., Hirayama, F., Uekama, K., & Arima, H. (2009). Involvement of PI3K-Akt-Bad pathway in apoptosis induced by 2, 6-di-O-methyl- β -cyclodextrin, not 2, 6-di-O-methyl- α -cyclodextrin, through cholesterol depletion from lipid rafts on plasma membranes in cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 38(3), 249–261.
- Motoyama, K., Toyodome, H., Onodera, R., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K., & Arima, H. (2009). Involvement of lipid rafts of rabbit red blood cells in morphological changes induced by methylated β -cyclodextrins. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(4), 700–705.
- Mueller, N. K., Dolgas, C. M., & Herman, J. P. (2004). Stressor-selective role of the ventral subiculum in regulation of neuroendocrine stress responses. *Endocrinology*, 145(8), 3763–3768.
- Mulisch, M., & Welsch, U. (2015). *Romeis-mikroskopische technik*. Springer-Verlag.
- Nadjar, Y., Hütter-Moncada, A. L., Latour, P., Aygnac, X., Kaphan, E., Tranchant, C., Cintas, P., Degardin, A., Goizet, C., Laurencin, C., & others. (2018). Adult Niemann-Pick disease type C in France: clinical phenotypes and long-term miglustat treatment effect. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1), 175.
- Naureckiene, S., Sleat, D. E., Lackland, H., Fensom, A., Vanier, M. T., Wattiaux, R., Jadot, M., & Lobel, P. (2000). Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science*, 290(5500), 2298–2301.
- Neßlauer, A.-M., Gläser, A., Gräler, M., Engelmann, R., Müller-Hilke, B., Frank, M., Burstein, C., Rolfs, A., Neidhardt, J., Wree, A., & others. (2019). A therapy with miglustat, 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and allopregnanolone restores splenic cholesterol homeostasis in Niemann-pick disease type C1. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 146.
- Neufeld, E. B., Wastney, M., Patel, S., Suresh, S., Cooney, A. M., Dwyer, N. K., Roff, C. F., Ohno, K., Morris, J. A., Carstea, E. D., & others. (1999). The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *Journal of Biological Chemistry*, 274(14), 9627–9635.
- Nigri, A., Ferraro, S., D'Incerti, L., Critchley, H. D., Bruzzone, M. G., & Minati, L. (2013). Connectivity of the amygdala, piriform, and orbitofrontal cortex during olfactory stimulation: a functional MRI study. *Neuroreport*, 24(4), 171–175.
- Nunes, M. J., Moutinho, M., Gama, M. J., Rodrigues, C. M. P., & Rodrigues, E. (2013). Histone deacetylase inhibition decreases cholesterol levels in neuronal cells by modulating key genes in cholesterol synthesis, uptake and efflux. *PloS One*, 8(1).
- O'Mara, S. (2006). Controlling hippocampal output: the central role of subiculum in hippocampal information processing. *Behavioural Brain Research*, 174(2), 304–312.
- Ong, W.-Y., Kumar, U., Switzer, R. C., Sidhu, A., Suresh, G., Hu, C.-Y., & Patel, S. C. (2001). Neurodegeneration in Niemann-Pick type C disease mice. *Experimental Brain Research*, 141(2), 218–231.
- Ory, D. S., Ottinger, E. A., Farhat, N. Y., King, K. A., Jiang, X., Weissfeld, L., Berry-Kravis, E., Davidson, C. D., Bianconi, S., Keener, L. A., & others. (2017). Intrathecal 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1–2 trial. *The Lancet*, 390(10104), 1758–1768.

- Ottinger, E., L Kao, M., Carrillo-Carrasco, N., Yanjanin, N., Kanakatti Shankar, R., Janssen, M., Brewster, M., Scott, I., Xu, X., Craddock, J., & others. (2014). Collaborative development of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for the treatment of Niemann-Pick type C1 disease. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14(3), 330–339.
- Özdikici, M. (2018). Volumetric evaluation of the paranasal sinuses with the cavalieri method. *Anatomy Physiol Biochem Int J*, 2, 1–3.
- Pallud, J., Häussler, U., Langlois, M., Hamelin, S., Devaux, B., Deransart, C., & Depaulis, A. (2011). Dentate gyrus and hilus transection blocks seizure propagation and granule cell dispersion in a mouse model for mesial temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 21(3), 334–343.
- Park, W. D., O'Brien, J. F., Lundquist, P. A., Kraft, D. L., Vockley, C. W., Karnes, P. S., Patterson, M. C., & Snow, K. (2003). Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: Correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Human Mutation*, 22(4), 313–325.
- Pasantes-Morales, H., & Tuz, K. (2006). Volume changes in neurons: hyperexcitability and neuronal death. In *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation* (Vol. 152, pp. 221–240). Karger Publishers.
- Patterson, M C. (2001). Niemann-Pick disease type C: a lipid trafficking disorder. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 3611–3634.
- Patterson, Marc C, Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M. T., Wijburg, F., Group, N.-C. G. W., & others. (2012). Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update. *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(3), 330–344.
- Patterson, Marc C, Mengel, E., Wijburg, F. A., Muller, A., Schwierin, B., Drevon, H., Vanier, M. T., & Pineda, M. (2013). Disease and patient characteristics in NP-C patients: findings from an international disease registry. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 12.
- Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press.
- Pentchev, P G, Boothe, A. D., Kruth, H. S., Weintraub, H., Stivers, J., & Brady, R. O. (1984). A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 259(9), 5784–5791.
- Pentchev, P G, Gal, A. E., Boothe, A. D., Fouks, J., Omodeo-Sale, F., & Brady, R. O. (1980). A lysosomal storage disorder in mice characterized by the accumulation of several sphingolipids. *Birth Defects Original Article Series*, 16(1), 225–230.
- Pentchev, Peter G. (2004). Niemann-Pick C research from mouse to gene. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 3–7.
- Pineda, Mercè, Walterfang, M., & Patterson, M. C. (2018). *Miglustat in Niemann-Pick disease type C patients : a review*. 1–21.
- Pineda, Mercedes, Jur'íková, K., Karimzadeh, P., Kolnikova, M., Malinova, V., Insua, J. L., Velten, C., & Kolb, S. A. (2019). Disease characteristics, prognosis and miglustat treatment effects on disease progression in patients with Niemann-Pick disease Type C: an international, multicenter, retrospective chart review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 32.
- Pineda, Mercedes, & Perez-Poyato, M. del S. (2013). Current and future therapies for Niemann-Pick C disease. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 1(11), 915–923.

- Pipalia, N. H., Cosner, C. C., Huang, A., Chatterjee, A., Bourbon, P., & Farley, N. (2011). *Histone deacetylase inhibitor treatment dramatically reduces cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C1 mutant human fibroblasts*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014890108/-DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1014890108>
- Plattm, F. M., Neisesn, G. R., Dweks, R. A., & Butters, T. D. (1994). *N-Butyldeoxynojirimycin Is a Novel Inhibitor of Glycolipid Biosynthesis*. *Journal of Lipid Research*, 35, 8362–8365.
- Porter, F. D., Scherrer, D. E., Lanier, M. H., Langmade, S. J., Molugu, V., Gale, S. E., Olzeski, D., Sidhu, R., Dietzen, D. J., Fu, R., & others. (2010). Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Science Translational Medicine*, 2(56), 56ra81–56ra81.
- Powell, J. G., Garland, S., Preston, K., & Piszczatoski, C. (2020). Brexanolone (Zulresso): Finally, an FDA-Approved Treatment for Postpartum Depression. *Annals of Pharmacotherapy*, 54(2), 157–163.
- Price, J. L., Ko, A. I., Wade, M. J., Tsou, S. K., McKeel, D. W., & Morris, J. C. (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 58(9), 1395–1402.
- Qi, X., Yuan, Y., Xu, K., Zhong, H., Zhang, Z., Zhai, H., Guan, G., & Yu, G. (2015). (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin Is a new angiogenic molecule for therapeutic angiogenesis. *PLoS One*, 10(5), e0125323.
- Raymond, A. A., Fish, D. R., Stevens, J. M., Cook, M. J., Sisodiya, S. M., & Shorvon, S. D. (1994). Association of hippocampal sclerosis with cortical dysgenesis in patients with epilepsy. *Neurology*, 44(10), 1841.
- Riban, V., Bouilleret, V., Pham-Le, B. T., Fritschy, J.-M., Marescaux, C., & Depaulis, A. (2002). Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*, 112(1), 101–111.
- Ries, M., Schaefer, E., Lührs, T., Mani, L., Kuhn, J., Vanier, M. T., Krummenauer, F., Gal, A., Beck, M., & Mengel, E. (2006). Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann–Pick disease type A/B and C. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, 29(5), 647–652.
- Rosen, G. D., & Harry, J. D. (1990). Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *Journal of Neuroscience Methods*, 35(2), 115–124.
- Rosenbaum, A. I., & Maxfield, F. R. (2011). Niemann-Pick type C disease: molecular mechanisms and potential therapeutic approaches. *Journal of Neurochemistry*, 116(5), 789–795.
- Royet, J.-P., Morin-Audebrand, L., Cerf-Ducastel, B., Haase, L., Issanchou, S., Murphy, C., Fonlupt, P., Sulmont-Rossé, C., & Plailly, J. (2011). True and false recognition memories of odors induce distinct neural signatures. *Frontiers in Human Neuroscience*, 5, 65.
- Runz, H., Dolle, D., Schlitter, A. M., & Zschocke, J. (2008). NPC-db, a Niemann-Pick type C disease gene variation database. *Human Mutation*, 29(3), 345–350.
- Saha, S., Roy, A., Roy, K., & Roy, M. N. (2016). Study to explore the mechanism to form inclusion complexes of β -cyclodextrin with vitamin molecules. *Nature Publishing Group, October*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35764>
- Sahay, A., Drew, M. R., & Hen, R. (2007). Dentate gyrus neurogenesis and depression. *Progress in Brain Research*, 163, 697–822.

- Sakiyama, T., Tsuda, M., Kitagawa, T., Fujita, R., & Miyawaki, S. (1982). A lysosomal storage disorder in mice: A model of Niemann-Pick disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 5(4), 239–240.
- Santos-lozano, A., García, D. V., Sanchis-gomar, F., Fiuza-, C., Pareja-galeano, H., Garatachea, N., Gadea, G. N., & Lucia, A. (2015). *Niemann-Pick disease treatment : a systematic review of clinical trials*. 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.12.04>
- Schedin, S., Sindelar, P. J., Pentchev, P., Brunk, U., & Dallner, G. (1997). Peroxisomal impairment in Niemann-Pick type C disease. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6245–6251.
- Schlegel, V. (2017). *Auswirkungen von Miglustat bzw. einer Kombination aus Miglustat, Cyclodextrin und Allopregnanolon auf das Lernverhalten und die motorische Koordination von BALB/c-Wildtypmäusen*. Universität.
- Schlegel, V., Thieme, M., Holzmann, C., Witt, M., Grittner, U., Rolfs, A., & Wree, A. (2016). Pharmacologic treatment assigned for Niemann Pick type C1 disease partly changes behavioral traits in wild-type mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1866.
- Schünke, M., Schulte, E., & Schumacher, U. (2015). *Prometheus Kopf, Hals und Neuroanatomie: LernAtlas Anatomie*. Thieme.
- Sedel, F., Chabrol, B., Audoin, B., Kaphan, E., Tranchant, C., Burzykowski, T., Tourbah, A., Vanier, M. T., & Galanaud, D. (2016). Normalisation of brain spectroscopy findings in Niemann--Pick disease type C patients treated with miglustat. *Journal of Neurology*, 263(5), 927–936.
- Sévin, M., Lesca, G., Baumann, N., Millat, G., Lyon-Caen, O., Vanier, M. T., & Sedel, F. (2007). The adult form of Niemann--Pick disease type C. *Brain*, 130(1), 120–133.
- Shulman, L. M., David, N. J., & Weiner, W. J. (1995). Psychosis as the initial manifestation of adult-onset Niemann-Pick disease type C. *Neurology*, 45(9), 1739–1743.
- Šimić, G., Kostović, I., Winblad, B., & Bogdanović, N. (1997). Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *Journal of Comparative Neurology*, 379(4), 482–494.
- Smith, D., Wallom, K.-L., Williams, I. M., Jeyakumar, M., & Platt, F. M. (2009). Beneficial effects of anti-inflammatory therapy in a mouse model of Niemann-Pick disease type C1. *Neurobiology of Disease*, 36(2), 242–251.
- Solomon, D., Winkelman, A. C., Zee, D. S., Gray, L., & BÜTTNER-ENNEVER, J. (2005). Niemann-Pick Type C Disease in Two Affected Sisters: Ocular Motor Recordings and Brain-Stem Neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1039(1), 436–445.
- Somers, K. L., Royals, M. A., Carstea, E. D., Rafi, M. A., Wenger, D. A., & Thrall, M. A. (2003). Mutation analysis of feline Niemann--Pick C1 disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 79(2), 99–103.
- Stein, V. M., Crooks, A., Ding, W., Prociuk, M., O'Donnell, P., Bryan, C., Sikora, T., Dingemanse, J., Vanier, M. T., Walkley, S. U., & others. (2012). Miglustat improves purkinje cell survival and alters microglial phenotype in feline Niemann-Pick disease type C. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 71(5), 434–448.
- Steinberg, S. J., Ward, C. P., & Fensom, A. H. (1994). Complementation studies in Niemann-Pick disease type C indicate the existence of a second group. *Journal of Medical Genetics*, 31(4), 317–320.

- Stockmeier, C. A., Mahajan, G. J., Konick, L. C., Overholser, J. C., Jurjus, G. J., Meltzer, H. Y., Uylings, H. B. M., Friedman, L., & Rajkowska, G. (2004). Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biological Psychiatry*, 56(9), 640–650.
- Stupien, G., Florian, C., & Roulet, P. (2003). Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(1), 32–41.
- Suthana, N. A., Ekstrom, A. D., Moshirvaziri, S., Knowlton, B., & Bookheimer, S. Y. (2009). Human hippocampal CA1 involvement during allocentric encoding of spatial information. *Journal of Neuroscience*, 29(34), 10512–10519.
- Suzuki, K. (1997). Niemann-Pick disease type C: neuropathology revisited. *Dev Brain Dysfunct*, 10, 306–320.
- Suzuki, Kipuko, Parker, C. C., Pentchev, P. G., Katz, D., Ghetti, B., D'Agostino, A. N., & Carstea, E. D. (1995). Neurofibrillary tangles in Niemann-Pick disease type C. *Acta Neuropathologica*, 89(3), 227–238.
- Swaab, D. F. (2003). Corpora mamillaria. *Handbook of Clinical Neurology. The Human Hypothalamus: Basic and Clinical Aspects. Part I: Nuclei of the Human Hypothalamus*. Amsterdam: Elsevier, 79, 291–295.
- Sze, C.-I., Troncoso, J. C., Kawas, C., Mouton, P., Price, D. L., & Martin, L. J. (1997). Loss of the presynaptic vesicle protein synaptophysin in hippocampus correlates with cognitive decline in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 56(8), 933–944.
- Tamura, A., & Yui, N. (2018). Polyrotaxane-based systemic delivery of β -cyclodextrins for potentiating therapeutic efficacy in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *Journal of Controlled Release*, 269, 148–158.
- Tanaka, J., Nakamura, H., & Mlyawaki, S. (1988). Cerebellar involvement in murine sphingomyelinosis: a new model of Niemann-Pick disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 47(3), 291–300.
- Tang, Q., Burgalossi, A., Ebbesen, C. L., Sanguinetti-Scheck, J. I., Schmidt, H., Tukker, J. J., Naumann, R., Ray, S., Preston-Ferrer, P., Schmitz, D., & others. (2016). Functional architecture of the rat parasubiculum. *Journal of Neuroscience*, 36(7), 2289–2301.
- Taube, J. S. (1995). Place cells recorded in the parasubiculum of freely moving rats. *Hippocampus*, 5(6), 569–583.
- Temel, R. E., Tang, W., Ma, Y., Rudel, L. L., Willingham, M. C., Ioannou, Y. A., Davies, J. P., Nilsson, L.-M., & Yu, L. (2007). Hepatic Niemann-Pick C1-like 1 regulates biliary cholesterol concentration and is a target of ezetimibe. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(7), 1968–1978.
- Thom, M. (2014). Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5), 520–543.
- Treiber, A., Morand, O., & Clozel, M. (2007). The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. *Xenobiotica*, 37(3), 298–314.
- Treiber, A., Morand, O., & Clozel, M. (2008). *The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat*. 8254.
<https://doi.org/10.1080/00498250601094543>.

- Trendelenburg, G., Vanier, M. T., Maza, S., Millat, G., Bohner, G., Munz, D. L., & Zschenderlein, R. (2006). Niemann–Pick type C disease in a 68-year-old patient. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 77(8), 997–998.
- Trepel, M. (2017). *Neuroanatomie : t ruktur und Funktion* (7. Auflage). Elsevier, Urban & Fischer.
- Ulfing, N. (2008). *Kurzlehrbuch Neuroanatomie*. Georg Thieme Verlag.
- Van Cauter, T., Camon, J., Alvernhe, A., Elduayen, C., Sargolini, F., & Save, E. (2013). Distinct roles of medial and lateral entorhinal cortex in spatial cognition. *Cerebral Cortex*, 23(2), 451–459.
- Van Hoesen, G. W., & Pandya, D. N. (1975). Some connections of the entorhinal (area 28) and perirhinal (area 35) cortices of the rhesus monkey. III. Efferent connections. *Brain Research*, 95(1), 39–59.
- Vance, J. E., Hayashi, H., & Karten, B. (2005). Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(2), 193–212.
- Vance, J. E., & Karten, B. (2014). Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *Journal of Lipid Research*, 55(8), 1609–1621.
- Vanier, M T, Duthel, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Pentchev, P., & Carstea, E. D. (1996). Genetic heterogeneity in Niemann-Pick C disease: a study using somatic cell hybridization and linkage analysis. *American Journal of Human Genetics*, 58(1), 118.
- Vanier, Marie T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(1), 16.
- Vanier, Marie T, Gissen, P., Bauer, P., Coll, M. J., Burlina, A., Hendriksz, C. J., Latour, P., Goizet, C., Welford, R. W. D., Marquardt, T., & Kolb, S. A. (2016). Diagnostic tests for Niemann-Pick disease type C (NP-C): A critical review. *Molecular Genetics and Metabolism*, 118(4), 244–254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.06.004>
- Vanier, Marie T, Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Gazzah, N., Juge, M.-C., Pentchev, P. G., Revol, A., & Louisot, P. (1991). Type C Niemann-Pick disease: spectrum of phenotypic variation in disruption of intracellular LDL-derived cholesterol processing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1096(4), 328–337.
- Vaughan, D. N., & Jackson, G. D. (2014). The Piriform Cortex and Human Focal Epilepsy. *Frontiers in Neurology*, 5, 259. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00259>.
- Vázquez, M. C., del Pozo, T., Robledo, F. A., Carrasco, G., Pavez, L., Olivares, F., González, M., & Zanlungo, S. (2011). Alteration of gene expression profile in Niemann-Pick type C mice correlates with tissue damage and oxidative stress. *PloS One*, 6(12), e28777.
- Vázquez, M. C., Balboa, E., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2012). *Oxidative tress : A Pathogenic Mechanism for Niemann-Pick Type C Disease*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/205713>.
- Videbech, P., & Ravnkilde, B. (2004). Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *American Journal of Psychiatry*, 161(11), 1957–1966.
- Vite, C. H., Bagel, J. H., Swain, G. P., Prociuk, M., Sikora, T. U., Stein, V. M., O'Donnell, P., Ruane, T., Ward, S., Crooks, A., & others. (2015). Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. *Science Translational Medicine*, 7(276), 276ra26–276ra26.
- Vöikar, V., Rauvala, H., & Ikonen, E. (2002). Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease. *Behavioural Brain Research*, 132(1), 1–10.

- Walkley, S. U. (2007). Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome. *Acta Paediatrica*, 96, 26–32.
- Walterfang, M., Patenaude, B., Abel, L. A., Klunemann, H., Bowman, E. A., Fahey, M. C., Desmond, P., Kelso, W., & Velakoulis, D. (2013). *Subcortical Volumetric Reductions in Adult Niemann-Pick Disease Type C: A Cross-Sectional Study*.
- Walterfang, Mark, Chien, Y.-H., Imrie, J., Rushton, D., Schubiger, D., & Patterson, M. C. (2012). Dysphagia as a risk factor for mortality in Niemann-Pick disease type C: systematic literature review and evidence from studies with miglustat. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(1), 76.
- Walterfang, Mark, Fietz, M., Fahey, M., Sullivan, D., Leane, P., Lubman, D. I., & Velakoulis, D. (2006). The neuropsychiatry of Niemann-Pick type C disease in adulthood. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 18(2), 158–170.
- Wang, J. M., Singh, C., Liu, L., Irwin, R. W., Chen, S., Chung, E. J., Thompson, R. F., & Brinton, R. D. (2010). Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), 6498–6503.
- Ward, S., O'Donnell, P., Fernandez, S., & Vite, C. H. (2010). 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with Niemann-Pick type C disease. *Pediatric Research*, 68(1), 52–56.
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Watari, M., Neufeld, E. B., Patel, S., Pentchev, P. G., & Strauss, J. F. (1999). Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21861–21866.
- Welford, R. W. D., Garzotti, M., Lourenco, C. M., Mengel, E., Marquardt, T., Reunert, J., Amraoui, Y., Kolb, S. A., Morand, O., & Groenen, P. (2014). Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study. *PLoS One*, 9(12), e114669.
- West, M. J. (1993). Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiology of Aging*, 14(4), 287–293.
- Williams III, R. O., Mahaguna, V., & Sriwongjanya, M. (1998). Characterization of an inclusion complex of cholesterol and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 46(3), 355–360.
- Williams, P. L. (1995). Gray's anatomy. *Nervous System*, 1240–1243.
- Wilson, D. A., Chapuis, J., & Sullivan, R. M. (2015). Cortical olfactory anatomy and physiology. *Handbook of Olfaction and Gustation*. 3rd Ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc, 209–227.
- Wingert, F. (1969). Biometrical analysis of growth functions of cerebral component parts and body weight. *Journal Fur Hirnforschung*, 11(1), 133.
- Witt, M., Thiemer, R., Meyer, A., Schmitt, O., & Wree, A. (2018). Main olfactory and vomeronasal epithelium are differently affected in Niemann-Pick disease type C1. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3563.
- Wree, A. (1986). Habilitation: *Reduktion der Plastizität des visuellen Systems in der postnatalen Ontogenese der Ratte*.
- Yamada, A., Saji, M., Ukita, Y., Shinoda, Y., Taniguchi, M., Higaki, K., Ninomiya, H., & Ohno, K. (2001). Progressive neuronal loss in the ventral posterior lateral and medial nuclei of thalamus in Niemann-Pick disease type C mouse brain. *Brain and Development*, 23(5), 288–297.

- Yévenes, L. F., Klein, A., Castro, J. F., Marín, T., Leal, N., Leighton, F., Alvarez, A. R., & Zanlungo, S. (2012). Lysosomal vitamin E accumulation in Niemann–Pick type C disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(2), 150–160.
- Yokoo, M., Kubota, Y., Motoyama, K., Higashi, T., Taniyoshi, M., Tokumaru, H., Nishiyama, R., Tabe, Y., Mochinaga, S., Sato, A., Sueoka-Aragane, N., Sueoka, E., Arima, H., Irie, T., & Kimura, S. (2015). 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. *PLOS ONE*, 10(11), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141946>.
- Yoshikawa, T. (2010). Human herpesvirus 6 encephalitis. *Brain and Nerve= Shinkei Kenkyu No Shinpo*, 62(8), 869–875.
- Zampieri, S., Mellon, S. H., Butters, T. D., Nevyjel, M., Covey, D. F., Bembi, B., & Dardis, A. (2009). Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(9b), 3786–3796.
- Zeiler, K., & Auff, E. (2007). *Klinische Neurologie II: Die wichtigsten neurologischen Erkrankungen für Human-und Zahnmediziner*. Facultas Verlags-und Buchhandels AG.
- Zelano, C., Montag, J., Khan, R., & Sobel, N. (2009). A specialized odor memory buffer in primary olfactory cortex. *PloS One*, 4(3).
- Zervas, M., Dobrenis, K., & Walkley, S. U. (2001). Neurons in Niemann-Pick disease type C accumulate gangliosides as well as unesterified cholesterol and undergo dendritic and axonal alterations. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(1), 49–64.
- Zervas, M., Somers, K. L., Thrall, M. A., & Walkley, S. U. (2001). Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Current Biology*, 11(16), 1283–1287.
- Zhou, S., Xu, S., Yan, Y., Yu, H., Ling, S., & Luo, J. (2011). Decreased purinergic inhibition of synaptic activity in a mouse model of Niemann-Pick disease type C. *Hippocampus*, 21(2), 212–219.
- Zilles, K., Schleicher, A., & Pehleemann, F. W. (1982). How many sections must be measured in order to reconstruct the volume of a structure using serial sections? *Microscopica Acta*, 86(4), 339–346.
- Zilles, Karl. (2010). Limbisches System. *Anatomie*, 745–748.

Internetquellen:

Allen Brain Atlas, Mouse, P56, Coronal (aufgerufen am 28.02.2020)

URL: <https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=1#atlas=1&structure=549&resolution=13.09&x=5536.250114440918&y=4143.124961853027&zoom=-3&plate=100960228>

BFR Bund (aufgerufen am 20.03.2020)

URL: <https://mobil.bfr.bund.de/cm/350/genomdatenvergleiche-zur-auswahl-geeigneter-tiermodelle.pdf>

BMBF, Bundesministerium für Bildung und Forschung (aufgerufen am 18.02.2020)

URL: <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/tiermodelle-2601.php>

Bundeministerium für Gesundheit (aufgerufen am 07.01.2020)

URL: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltenerkrankungen.html>

Bundesministerium für Gesundheit (aufgerufen am 06.04.2020)

URL: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltenerkrankungen.html>

Deutschlandfunk (aufgerufen am 04.04.2020)

URL: https://www.deutschlandfunk.de/seltene-krankheiten-wenn-forschung-nicht-lukrativ-ist.724.de.html?dram:article_id=346946

European Medicines Agency, Zervesca Produkteigenschaften (aufgerufen am 23.01.2020)

URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu306351>

Genomeyear (aufgerufen am 09.01.2020)

URL: <http://www.genomeyear.net/wp-content/uploads/2016/11/Niemann-Pick-C-Brown-and-Goldstein.png>

GIT Laborportal (aufgerufen am, 18.02.2020)

URL: <https://www.git-labor.de/forschung/life-sciences-biotechnologie/tiermodelle-der-praeklinischen-forschung>

Max Planck Gesellschaft (aufgerufen am 20.03.2020)

URL: <https://www.mpg.de/10888547/warum-erforschen-wissenschaftler-maeuse>

National Center of Advancing Translational Sciences, National Institutes of Health (aufgerufen am 11.02.2020)

URL: <https://ncats.nih.gov/trnd/projects/complete/cyclodextrin-niemann-pick>

Neurologienetz (aufgerufen am 08.01.2020)

URL: <https://www.neurologienetz.de/fachliches/erkrankungen/speicherkrankheiten/niemann-pick-krankheit>,

PubChem Databank, Cyclodextrin (aufgerufen am 21.02.2020)

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/44134771>

PubChem Databank, Miglustat (aufgerufen am 21.01.2020)

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/51634>

PubChem Databank, Allopregnanolone (aufgerufen am 27.01.2020)

URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Allopregnanolone>

The Jackson Laboratory (aufgerufen am 20.03.2020)

URL: <https://www.jax.org/strain/003092>

U.S. Food and Drug Administration (aufgerufen am 11.02.2020)

URL: <https://www.fda.gov/regulatory-information/food-and-drug-administration-safety-and-innovation-act-fdasia/frequently-asked-questions-breakthrough-therapies>

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Physiologische Funktionsweise der Proteine NPC1 und NPC2 im Lysosomen.....	3
Abbildung 2: Schema zum zeitlichen Verlauf und der klinischen Symptomatik vom NPC1.....	7
Abbildung 3: 2D-Struktur von Miglustat (N-butyldeoxynojirimycin).....	9
Abbildung 4: 2D-Stuktur von Allopregnanolone (Allopregnan-3 α -ol-20-one)	11
Abbildung 5: 2D-Struktur von HP β CD (2-hydroxypropyl- β -HP β CD).....	12
Abbildung 6: Anatomie des Hippocampus	19
Abbildung 7: Zytoarchitektur Hippocampus	20
Abbildung 8: Erregender Neuronenkreis im Hippocampus	20
Abbildung 9: Schema zur Pharmakologischen Therapie	27
Abbildung 10: Begrenzung der Areale CA1, CA2 und CA3	31
Abbildung 11: Begrenzung des Gyrus dentatus.....	32
Abbildung 12: Begrenzung des Subiculum	33
Abbildung 13: Begrenzung von Prä-, Post- und Parasubiculum.....	34
Abbildung 14: Begrenzung der Area entorhinalis	35
Abbildung 15: Begrenzung des piriformen Kortex.....	36
Abbildung 16: Darstellung der normalverteilten Schrumpfungsfaktoren.....	40
Abbildung 17: Darstellung zur Verteilung des Körpergewichts innerhalb der Therapiegruppen.....	42
Abbildung 18: Darstellung zur Verteilung der Hirngewichte innerhalb der Gruppen.....	44
Abbildung 19: Darstellung des Hirn-/Körpergewicht-Quotienten innerhalb der Versuchsgruppen....	46
Abbildung 20: Darstellung zur Verteilung der Volumina von CA1 innerhalb der Versuchsgruppen..	47
Abbildung 21: Darstellung zur Verteilung der Volumina in CA3 in den verschiedenen Gruppen	49
Abbildung 22: Volumetrische Unterschiede im Gyrus dentatus innerhalb der Versuchsgruppen.....	51
Abbildung 23: Volumetrische Unterschiede im Subiculum innerhalb der Versuchsgruppen	53
Abbildung 24: Volumenunterschiede des Prä- und Parasubiculums innerhalb der Gruppen	55
Abbildung 25: Volumenunterschiede der Area entorhinalis innerhalb der Gruppen.....	57
Abbildung 26: Volumenunterschiede des piriformen Kortex innerhalb der Gruppen.....	59

7 Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung des Schrumpfungsfaktors	37
Formel 2: Berechnung des Frischvolumens	37
Formel 3: Berechnung des Schnittvolumens.....	38

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung erkrankter und gesunder Versuchstiere in Gruppen.....	27
Tabelle 2:	Mittelwerte der SF innerhalb der Genotypen	40
Tabelle 3:	Mittelwerte der SF innerhalb des Geschlechts	41
Tabelle 4:	Mittelwerte der SF innerhalb der Behandlungsgruppen.....	41
Tabelle 5:	Vergleiche der Körpergewichte	43
Tabelle 6:	Vergleiche der Hirngewichte.....	45
Tabelle 7:	Vergleich des Quotienten aus Hirn- und Körpergewicht innerhalb der Sham-Gruppe	46
Tabelle 8:	Vergleiche der Volumina von CA1	48
Tabelle 9:	Vergleiche der Volumina in CA3	50
Tabelle 10:	Vergleiche der Volumina des Gyrus dentatus	52
Tabelle 11:	Vergleiche der Volumina im Subiculum	54
Tabelle 12:	Vergleiche der Volumina im Prä- und Parasubiculum	56
Tabelle 13:	Vergleiche der Volumina der Area entorhinalis.....	58
Tabelle 14:	Vergleiche der Volumina des piriformen Kortex	60
Tabelle 15:	Gesamtübersicht der Versuchstiere	103

9 Thesen

- I. Morbus Niemann-Pick Typ C1 (NPC1) ist eine seltene autosomal-rezessive vererbte Lipidspeicherkrankheit, die bisher nicht kurativ behandelt werden kann.
- II. Durch die Mutation des NPC1-Gens kommt es zu einer heterogenen Akkumulation diverser Lipide und neuronaler Degenerationsprozesse.
- III. Das limbische System ist wesentlich an der Gedächtnisbildung und der Orientierung im Raum beteiligt.
- IV. Frühere wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass NPC1 erkrankte Patienten und Tiere kognitive Einbußen aufweisen. Im Zuge dessen besteht die Aufgabe dieser Studie in der Analyse der Volumenveränderung des limbischen Systems NPC1 defizienter BALB/c-Mäuse.
- V. Es kommt zu einer ausgeprägten neurodegenerativen Beteiligung des limbischen Systems und im engeren Sinne zu Volumenreduktionen der Regionen CA1, CA3, Gyrus dentatus, Subiculum, Prä- und Parasubiculum, Area entorhinalis und des piriformen Kortex.
- VI. Der neurodegenerative Progress des Morbus Niemann-Pick Typ C1 präsentiert sich unter anderem in Form von Hirnsubstanzverlusten und nachfolgender Volumenreduktionen, die sich beim Vergleich gesunder und kranker Tiere als teilweise signifikant reduzierte Messwerte bei den erkrankten Tieren darstellen.
- VII. Morbus Niemann-Pick Typ C1 bedingt eine Reduktion des Körpergewichts.
- VIII. Kombinations-, Miglustat- und HPβCD-Therapie haben einen Einfluss auf den krankheitsbedingten Volumenverlust innerhalb des limbischen Systems und schwächen diesen in fast allen betrachteten Arealen ab.
- IX. Sowohl die Miglustat- als auch die Kombinationstherapie zeigen sich im Hinblick auf die Reduktion des krankheitsbedingten Volumenverlusts innerhalb des limbischen Systems der HPβCD-Monotherapie überlegen.
- X. Kombinations-, Miglustat – und HPβCD-Therapie haben einen Einfluss auf den krankheitsbedingten Gewichtsverlust und schwächen diesen ab.
- XI. Im Hinblick auf die Prävention des krankheitsbedingten Gewichtsverlusts zeigt sich die Miglustat Monotherapie den anderen beiden Therapieregimen überlegen.
- XII. Eine therapeutische Intervention führt bei gesunden Versuchstieren in Abhängigkeit des betrachteten Areals und der verwendeten Behandlung zu einer heterogen Volumenzu- oder -abnahme.
- XIII. Eine therapeutische Intervention führt bei gesunden Versuchstieren, je nach verwendeter Behandlung, zu einer Körpergewichtszu- oder abnahme.

- XIV.** Die Therapieregime wirken innerhalb des limbischen Systems oder ferner des neuronalen Systems heterogen, was auf individuelle Eigenschaften der betrachteten Hirnregionen oder auf unerwünschte Nebenwirkungen der verwendeten Medikamente zurückzuführen ist.
- XV.** Quantitative Daten zum Verständnis der Neurodegeneration des limbischen Systems unter NPC1 sind bisher nicht ausreichend vorhanden.
- XVI.** Quantitative Daten zum Verständnis therapeutischer Auswirkungen auf das limbische System NPC1 defizienter Versuchstiere sind bisher nicht ausreichend vorhanden.

10 Anhang

10.1 PCR-Protokoll für die Genotypisierung

Primer:

- NPC-WT-P1
- NPC-WT-P2
- NPC-KO-P1
- NPC-KO-P2

Ansetzen der Primer:

- Primer abzentrifugieren und mit autoklavierten Wasser lösen
- 15 Minuten bei 37°C inkubieren
- Aliquotierung
- Lagerung bei – 20°C

Working stock ansetzen:

- WT-working stock: beide WT-Primer zusammen ansetzen
- KO-working stock: beide KO-Primer zusammen ansetzen
- für 200 µl working stock: 20µl upload Primer + 20µl download Primer + 160 µl autoklaviertes Wasser
- aliquotieren, Lagerung bei -20°C

Herstellung der Template-DNA:

- 1ml DirectPCR Lysis Reagent Tail (Peqlab) + 10µl Proteinase K (Peqlab, 20mg/ml) mischen
- 200µl pro Schwanzbiopsie in 1,5ml Tube
- Denaturierung über Nacht (16h) nach Programm P1 – S1
- bei 6000 U/min 30s abzentrifugieren
- Lagerung der Template-DNA für eine Woche bei 4°C oder für ein Jahr bei – 20°C

Mastermix ansetzen: (peqGold Taq-DNA-Polymerase „all-inklusive“-Kit, Peqlab)

- je NPC1-Tier jeweils ein PCR-Durchlauf mit KO-Primern bzw. WT-Primern (2 x 20µl)
- Mastermix muss einmal mit KO-Primern beziehungsweise mit WT-Primern extra angesetzt werden
- eine Probe enthält 20 µl Mastermix + 2 µl Template-DANN

für 100µl Mastermix:

- 10µl 10 x Reaktionspuffer
- 20µl 5x Enhancer Solution P
- 2 µl dNTP-Mix
- 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 52 µl autoklaviertes Wasser
- 10 µl KO-working stock oder WT-working stock

10.2 Fixierung nach Bodian**Anästhesie:**

- Bereitstellung eines Narkosetopfes auf einem mit Isofluran getränktem Tuch
- Maus in den Topf setzen
- Maus wiegen

Perfusion:

- die betäubte Maus entnehmen und 0,1 ml Mausmix auf 10g KG in den Bauchraum injizieren
- Überprüfen der Reaktion
- Fixierung und Eröffnung der Bauchraums
- Präparation des Herzens und Eröffnung des linken Vorhofs
- Kanüle des Infusionsschlauchs einführen
- System mit 0,9% NaCl spülen
- helle Leberfarbe dient als Indikator für Zeitpunkt der Infusion mit Bodian-Lösung
- entfernen des Infusionssystems nach Durchlauf von circa 50 ml Bodian Lösung

Präparation:

- Abtrennen des Kopfes
- mit Knochenzange den Schädelknochen entfernen
- Hirnhaut abpräparieren
- Wiegen des Gehirns
- Einbetten in Bodian-Lösung

Fixierung:

500 ml Bodian-Lösung:

- 450 ml 80% 2-Propanol, 4°C (CAS-Nr.: 67-63-0, Chemosolute)
- 25 ml 37% Formaldehydlösung (CAS-Nr.: 50-00-1, Merck)
- 25 ml 99 – 100 % Essigsäure (CAS-Nr.: 64-19-7, JT Baker)

Entwässerung:

- 2 x Spülen mit 70% 2-Propanol
- 1 x 80% 2-Propanol
- 1 x 90 % 2-Propanol
- 1 x 96% 2-Propanol
- 1 x 96% 2-Propanol und Eosin
- 2 x 2-Propanol

Einlagerung:

- Methylbenzoat (CAS-Nr.: 93-58-3, Merck)

Ausguss in Paraffin:

- 5 Stunden bei 52 bis 55°C im Brutschrank in Paraffin ausgießen (CAS-Nr.: 80002-74-2, Merck)

Mikrotomschnitte:

- bei einem Messer-Winkel von 1 – 5 °C 20 µm dicke frontale Serienschnitte
- Aufziehen auf Objektträger (SuperFrost, Menzel)

10.3 Histologische Färbung nach Nissl**Entparaffinisierung:**

- 20 Minuten Xylol (CAS-Nr.: 1330-20-7, JT Baker)
- jeweils 1 Minute in absteigender Alkoholreihe (CAS-Nr.: 67-63-0, Carl Roth)
100% - 96% - 90% - 80% - 70%
- 3 x 5 Minuten mit destilliertem Wasser spülen

Färbung:

- 0,1% Kresylviolett-Lösung (CAS-Nr.: 10510-54-0, Sigma-Aldrich) bei 60°C im Brutschrank

Differenzierung:

- jeweils 1 Minute in aufsteigender Alkoholreihe
70% - 80% - 90% - 96% - 100%

Nachbehandlung:

- 2 x 5 bis 10 Minuten Xylol (CAS-Nr.: 1330-30-7, JT Baker)

Eindecken:

- Pertex (CAS-Nr.: 41-4012-00, Medite)

10.4 Verwendete Geräte und Software

Software

SigmaPlot 14, Systat Software Inc., San Jose, CA 95110, USA

ImageJ, Java-based, Version 1.52, Wayne Rasband, National Institutes of Health, 2018

Allen Brain Atlas Data Portal, The Allen Institute for Brain Science, 2020, Washington, USA

Microsoft Word, 2010, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA

Microsoft Excel, 2010

Microsoft PowerPoint, 2010

Geräte

Mikroskop mit Zeichenarm, Carl Zeiss

Verwendete und nicht genannte Laborgeräte entsprachen den üblichen Standards. Eingesetzte und nicht gelistete Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Merck, Carl Roth, Biogenix oder Chemicon erworben. Alle aufgeführten Produkte wurden ohne ® und TM Zeichen aufgeführt. Dabei ist nicht auszuschließen, dass es sich um geschützte Chemikalien, Medikamente oder Geräte handelt.

10.5 Gesamtübersicht der Versuchstiere

Tabelle 15: Gesamtübersicht der Versuchstiere

Tier Nr.	Geno type	Treat ment	G	body weight	brain weigh t	SF	CA1	CA3	DG	S	PS	AE	Piri
2334	NPC1+/ +	Sham	f	22,61	0,455	0,604	3,421	2,247	2,498	2,637	1,853	6,508	8,226
2787	NPC1+/ +	Sham	m	27,75	0,491	0,561	3,996	2,985	2,826	2,532	1,473	5,598	6,741
2789	NPC1+/ +	Sham	m	29,63	0,472	0,585	3,806	2,297	2,201	1,741	1,914	6,077	8,012
2793	NPC1+/ +	Sham	f	22,50	0,474	0,566	4,283	3,354	2,959	2,396	1,196	3,498	7,021
2802	NPC1+/ +	Sham	m	25,50	0,481	0,609	4,208	2,852	2,470	1,904	1,031	5,337	8,058
2805	NPC1+/ +	Sham	m	24,50	0,476	0,582	3,570	3,059	2,933	1,786	1,982	3,258	6,535
2818	NPC1+/ +	Sham	f	23,20	0,493	0,673	3,559	3,016	2,445	1,845	1,832	6,036	6,425
2819	NPC1+/ +	Sham	f	22,90	0,485	0,556	4,194	2,565	3,043	2,566	2,553	3,814	9,373
3119	NPC1+/ +	Sham	f	28,00	0,463	0,602	4,207	2,571	2,649	2,778	1,408	5,272	6,723
3123	NPC1+/ +	Sham	m	23,50	0,449	0,620	3,787	2,713	2,342	2,197	1,182	3,509	6,730
3126	NPC1+/ +	Sham	f	23,00	0,475	0,622	4,551	2,872	2,544	2,060	1,786	4,590	7,134
3359	NPC1+/ +	Com bi	f	23,50	0,460	0,588	5,044	2,946	2,791	2,493	1,802	6,134	5,874
3368	NPC1+/ +	Com bi	m	23,00	0,450	0,595	4,518	3,438	2,885	2,601	1,660	4,666	7,167
3561	NPC1+/ +	Com bi	m	23,50	0,460	0,603	4,351	3,055	2,537	2,381	1,021	5,571	7,063
3586	NPC1+/ +	Com bi	m	23,00	0,449	0,638	4,134	2,829	2,021	2,537	1,349	5,673	6,465
3588	NPC1+/ +	Com bi	f	20,00	0,463	0,604	4,199	2,811	2,475	2,358	1,503	5,013	7,508
3590	NPC1+/ +	Com bi	m	21,00	0,432	0,627	3,744	3,121	2,470	2,577	1,126	5,350	6,675
3965	NPC1+/ +	Migl u only	m	28,00	0,474	0,650	4,401	2,893	2,209	2,377	1,747	4,758	6,523
3377	NPC1+/ +	CD only	m	24,50	0,461	0,583	3,792	3,404	2,716	2,623	1,522	3,911	6,244
3645	NPC1+/ +	CD only	m	21,00	0,436	0,652	3,453	2,650	2,097	2,215	1,330	3,669	6,026
3896	NPC1+/ +	CD only	m	24,00	0,471	0,620	3,917	3,417	2,239	2,516	1,568	2,990	7,120
3898	NPC1+/ +	CD only	m	21,00	0,436	0,639	3,715	2,842	2,137	2,364	1,050	4,120	5,102
3931	NPC1+/ +	CD only	m	23,50	0,479	0,644	4,082	2,961	2,282	1,946	1,346	3,105	7,220
3937	NPC1+/ +	CD only	m	23,50	0,473	0,655	4,271	3,162	2,452	2,269	1,054	5,270	6,500
2356	NPC1-/-	Sham	f	13,40	0,394	0,671	2,926	2,550	2,074	1,511	1,589	3,753	6,472
2722	NPC1-/-	Sham	m	11,90	0,357	0,656	2,925	2,063	1,953	1,848	1,028	3,031	5,964
2724	NPC1-/-	Sham	m	14,10	0,370	0,627	3,111	2,499	2,270	2,415	1,389	5,108	5,715

2725	NPC1-/-	Sham	f	11,20	0,342	0,666	2,887	2,301	2,016	1,733	1,078	3,137	5,714
2731	NPC1-/-	Sham	m	14,00	0,371	0,527	3,296	2,678	2,668	2,684	1,489	3,999	5,761
2741	NPC1-/-	Sham	f	12,80	0,381	0,633	2,893	2,582	2,094	1,527	1,667	4,509	4,916
2744	NPC1-/-	Sham	f	13,70	0,382	0,589	3,061	2,920	2,258	1,325	1,467	3,859	6,541
2780	NPC1-/-	Sham	f	15,60	0,385	0,594	3,183	2,660	2,259	1,419	1,745	3,450	5,006
2816	NPC1-/-	Sham	f	14,90	0,386	0,696	3,358	2,568	2,061	1,645	1,679	4,183	6,710
3552	NPC1-/-	Com bi	m	20,50	0,409	0,639	4,252	2,982	2,616	2,324	1,401	5,210	5,506
3602	NPC1-/-	Com bi	m	20,50	0,400	0,650	3,272	2,573	2,290	2,447	1,176	4,242	6,631
3647	NPC1-/-	Com bi	f	19,50	0,420	0,622	4,492	2,882	2,353	2,004	1,614	3,571	6,063
3649	NPC1-/-	Com bi	f	16,50	0,404	0,607	3,661	3,254	2,495	2,761	1,289	5,049	7,430
3672	NPC1-/-	Com bi	m	17,50	0,342	0,629	3,193	2,777	1,940	1,870	1,052	3,917	4,442
3873	NPC1-/-	Com bi	f	19,50	0,413	0,639	4,808	3,385	2,618	2,113	1,446	5,118	5,811
3880	NPC1-/-	Migl u only	m	22,00	0,420	0,655	4,479	3,086	2,599	2,634	1,102	4,724	5,787
3890	NPC1-/-	Migl u only	m	24,00	0,410	0,674	4,265	2,643	2,363	2,985	1,385	5,153	5,957
3961	NPC1-/-	Migl u only	f	22,00	0,416	0,671	3,631	3,116	2,377	2,360	1,159	4,103	6,360
3967	NPC1-/-	Migl u only	f	20,00	0,384	0,599	3,385	2,769	2,297	2,487	1,112	4,082	5,814
3383	NPC1-/-	CD only	m	18,50	0,348	0,696	3,070	2,609	1,981	1,935	1,069	4,219	4,987
3894	NPC1-/-	CD only	m	23,00	0,439	0,636	3,919	3,304	2,064	2,435	1,291	3,312	5,857
3903	NPC1-/-	CD only	f	18,00	0,408	0,589	3,751	2,535	2,223	1,879	1,259	4,471	6,008
4065	NPC1-/-	CD only	m	20,00	0,407	0,571	3,290	2,834	2,076	2,027	1,154	3,663	6,174
4111	NPC1-/-	CD only	f	20,50	0,456	0,583	4,128	2,773	2,711	2,477	1,359	5,030	7,228
4444	NPC1-/-	CD only	m	23,30	0,405	0,595	3,302	2,730	2,115	1,998	0,915	3,493	5,362

CA1 – Cornu Ammonis Region 1, CA3 – Cornu Ammonis Region 3, DG – Gyrus dentatus, S – Subiculum, PS – Prä – und Parasubiculum, AE – Area entorhinalis, PIRI – piriformer Kortex, G – gender, Sham – scheinbehandelte Tiere, Combi – kombinationsbehandelte Tiere, Miglu only – Miglustatmonotherapierte Tiere, CD only – Cyclodextrin (HP β CD)-monotherapierte Tiere

10.6 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

10.7 Anerkennung

Susann Lehmann und Matthias Lietz haben maßgeblich zur Aufzucht und Pflege der Mäuse beigetragen. Die Genotypisierung erfolgte durch Susann Lehmann. Frau Winzer widmete sich der Fixierung und Färbung der Versuchstiere.

10.8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt besonders meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Prof. Andreas Wree, der mir eine medizinische Forschungsarbeit am Institut für Anatomie ermöglichte und zugleich ein spannendes Dissertationsthema vermittelte. Ich bedanke mich für Ihre stets zuverlässige, inspirierende und herzliche Unterstützung während der gesamten Arbeit und Ihr Vertrauen in mich, dem gewählten Promotionsthema gerecht zu werden. Sie haben einen unglaublich bedeutsamen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. rer. nat. Theresa Mann und Herrn Dr. rer. nat. Jonas Keiler, die mich nicht nur herzlich am Institut für Anatomie willkommen geheißen haben sondern mich auch mit allen notwendigen Geräten und Softwareprogrammen vertraut machten.

Des Weiteren möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. rer. nat. Carsten Holzmann für seine maßgebliche Unterstützung bei der statistischen Auswertung und seinen geduligen Erklärungen bedanken, die mir eine ausgezeichnete Ergebnisdarstellung der gesammelten Daten ermöglichten.

Ebenso danke ich meiner Kollegin Diana Heimes für die gewissenhafte Bearbeitung gemeinsamer Fragestellungen und ihre stets gut gemeinten und hilfreichen Ratschläge.

Einen besonderen Dank möchte ich außerdem Frau Frauke Winzer, Frau Susann Lehmann und Herrn Matthias Lietz aussprechen für Ihren entscheidenden Beitrag zur Aufzucht und Pflege der Versuchstiere und der exzellenten histologischen Aufarbeitung.

Des Weiteren möchte ich auch Frau Dr. Antipova und allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Instituts für Anatomie der Universität Rostock und des Albrecht-Kossel-Instituts für Neuroregeneration danken, die mir bei fachlichen Fragen stets mit wissenschaftlich fundierten Antworten aushalfen.

Ich danke außerdem meinen liebsten Freunden, die mir zum Teil seit Schulzeiten zur Seite stehen und mich auf allen Lebenswegen unterstützen. Ihr habt die Studienzeit zu einer der wunderbarsten Zeiten überhaupt gemacht.

Zu guter Letzt möchte ich meinen liebevollen Eltern Manuela und Falk Seidel, meiner stets mitfiebernden Schwester Mia und meinem besten Freund und Lebensgefährten Jensi danken.

Danke für eure ideelle und finanzielle Unterstützung in allen Lebenslagen,

für euer bedingungsloses Vertrauen in mich,

und dafür, dass ihr mein Leben so unglaublich schön macht.

Ohne euch, wäre ich nicht der Mensch, der ich bin.

Danke für den notwendigen Schubs, Papa!

10.9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Katharina Seidel
Geburtsdatum: 31.03.1995
Geburtsort: Neubrandenburg

Schulbildung

Zeitraum: 2001 - 2005
Institution: Grundschule Ost – „Hans-Christian-Andersen—Neubrandenburg

Zeitraum: 2005 – 2013
Institution: Sportgymnasium Neubrandenburg – „Eliteschule des Sports—

Abschluss: **Allgemeine Hochschulreife / Abitur - 06/2013**

Zeitraum: 12/2013 – 06/2014
„Work and Travel—in Australien und Indonesien

Studium

Zeitraum: 10/2014 – 10/2019
Studium der Humanmedizin
Institution: Universitätsmedizin Rostock

Abschlüsse: **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - 09/2016**
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung - 10/2019

Studium

Zeitraum: ab 18.05.2020
Studium der Humanmedizin / Praktisches Jahr
Institution: DRK Krankenhaus Mecklenburg-Strelitz

Promotions- und Forschungsarbeit: Experimentelle Forschungsarbeit am Institut für Anatomie,
NPC1-Arbeitsgruppe der Universitätsmedizin Rostock

Institutsleiter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Markus Kipp

Betreuer und
Themenvergeber: Prof. Dr. med. A. Wree